

THESIS / THÈSE

MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE

Contribution à l'étude de la régulation du système flagellaire de Brucella

Ferooz, Jonathan

Award date:
2003

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



**FACULTÉS UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR**

Faculté des Sciences

Contribution à l'étude de la régulation du système flagellaire chez *Brucella*

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
licencié en Sciences biologiques**

Jonathan FERROOZ

Juin 2003

**Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
FACULTE DES SCIENCES**

Secrétariat du Département de Biologie
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR
Téléphone!: + 32(0)81.72.44.18 - Téléfax: + 32(0)81.72.44.20
E-mail: joelle.jonet@fundp.ac.be - <http://www.fundp.ac.be/fundp.html>

Contribution à l'étude de la régulation du système flagellaire chez *Brucella*.

FEROOZ Jonathan

Résumé

Brucella est une bactérie pathogène considérée comme non mobile et non flagellée depuis sa découverte en 1887. Cependant, une trentaine de gènes flagellaires répartis en 3 loci ont été détectés ces dernières années dans les génomes de *B. melitensis* et *B. suis* et l'expression de trois gènes flagellaires a été démontrée.

Dans la première partie de ce travail nous avons étudié le rôle de trois régulateurs transcriptionnels potentiels des gènes flagellaires de *B. melitensis* 16M : 2c2, VjbR et TetR. En comparant des mutants de ces régulateurs à la souche sauvage nous avons étudié soit l'activité du promoteur du gène *fliF* (encodant le MS-ring du corps basal) en utilisant le rapporteur *lacZ*, soit l'expression des protéines FlgE (monomère du « hook ») et FliC (filament), par western blotting. Les résultats montrent que 2c2 et VjbR sont nécessaires à l'induction du promoteur de *fliF* et à l'expression de FlgE et FliC.

Nous avons également construit 3 plasmides d'une part pour compléter les mutants flagellaires *fliF* et *2c2* et d'autre part pour surexprimer la protéine 2c2 en vue de la purifier. Nous avons montré qu'une copie sauvage du gène 2c2 complète le phénotype du mutant 2c2.

En parallèle, nous avons cherché à visualiser, en microscopie électronique, la présence d'une structure flagellaire chez *B. melitensis* 16M dans les conditions d'expression des gènes flagellaires. Nous avons observé après coloration négative la présence d'une structure filamenteuse chez *B. melitensis* 16M.

Mémoire de licence en Sciences biologiques

Juin 2003

Promoteur: Prof. J.-J. Letesson

1. Le flagelle bactérien

Le flagelle bactérien est une structure hélicoïdale, filamenteuse, d'un diamètre compris entre 12 et 25 nm, et d'une longueur variant de 5 à 15 µm. On distingue trois parties dans cette structure : une première partie nommée corps basal (« basal body ») ancrée dans la membrane et l'enveloppe bactérienne, une seconde partie correspondant au coude (« hook ») est exposée à la surface bactérienne et une troisième partie constituée du filament qui se prolonge à l'extérieur de la bactérie et forme la partie visible du flagelle (Figure 1).

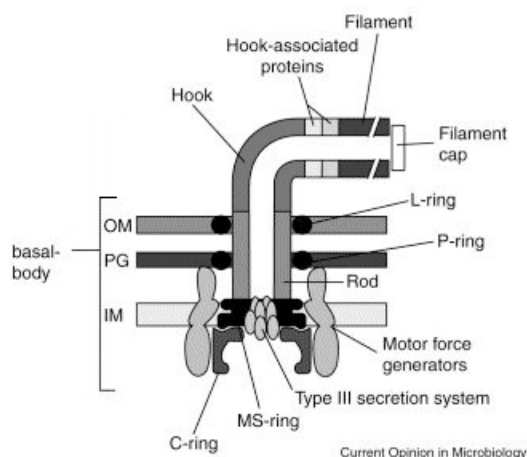


Figure 1: Représentation schématique du flagelle bactérien. Le flagelle est composé du corps basal, du « hook » et du filament⁴.

Le flagelle bactérien sert principalement à la mobilité de la bactérie grâce à son mouvement rotatoire, mais il a également d'autres fonctions comme par exemple l'adhérence à un substrat et même dans un cas décrit, la sécrétion d'au moins une protéine de virulence¹⁴. Environ cinquante gènes sont nécessaires à sa synthèse et à son fonctionnement. Il s'agit de gènes encodant des protéines régulatrices, des sous-unités structurales, un appareil d'exportation, une machinerie générant une force motrice et un système du chimiotactisme.

La localisation et le nombre de flagelles varient selon les espèces bactériennes et parfois même au sein d'une espèce donnée. On parle de « bactérie monotriche » (par exemple *Caulobacter crescentus*, *Campylobacter jejuni*) lorsqu'un seul flagelle est observé et de « bactérie péritriche » si plusieurs flagelles sont répartis autour de la bactérie (par exemple *Salmonella typhimurium*¹ et *Escherichia coli*).

Il existe aussi des « bactéries lophotriches », comme par exemple *Spirillum spp.*, dont les flagelles sont disposés en touffe à l'extrémité de la cellule.

Les chapitres suivants introduiront la structure et la régulation de l'assemblage du flagelle chez les entérobactéries (comme *S. typhimurium* et *E. coli*) car le flagelle a été très bien étudié chez ces bactéries.

¹ Le nouveau nom officiel est *Salmonella enterica* serovar Typhimurium

Brucella faisant partie des α -protéobactéries, nous décrirons deux α -protéobactéries chez lesquelles le flagelle a été également bien décrit et étudié : *Caulobacter crescentus* et *Sinorhizobium meliloti*.

2. Structure et fonctionnement du flagelle chez les entérobactéries

La structure du flagelle a particulièrement été étudiée chez les deux entérobactéries *S. typhimurium* et *E. coli*, nous nous baserons donc principalement sur ces modèles bactériens dans les paragraphes suivants^{2, 3} (Figure 2).

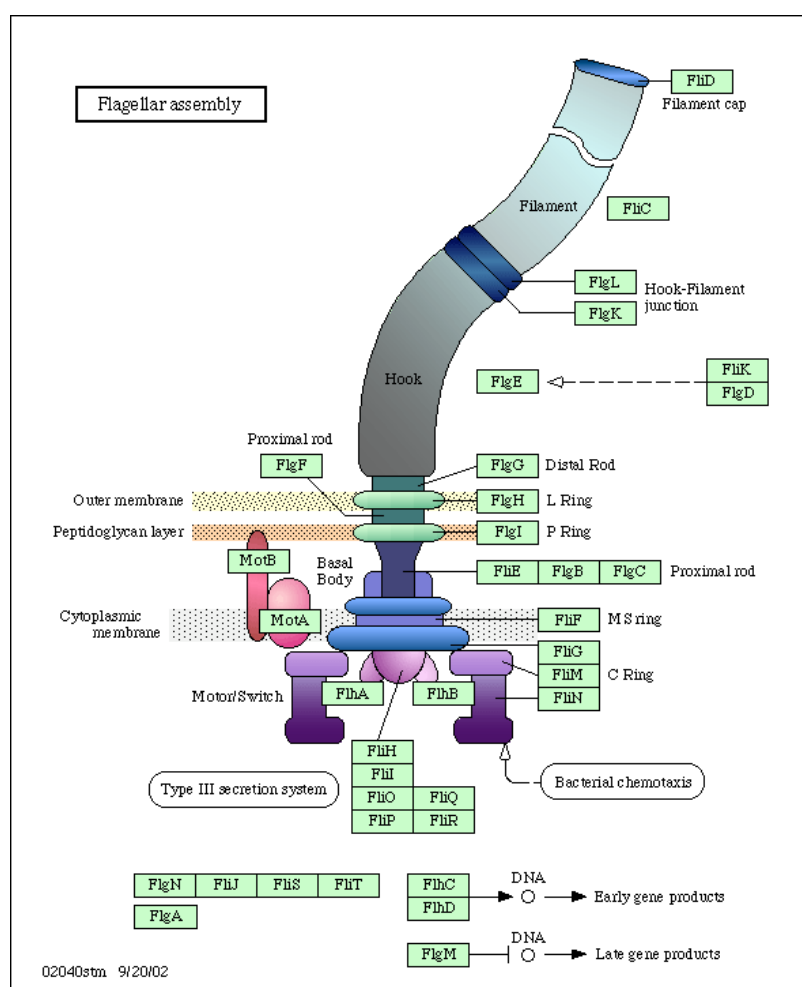


Figure 2 : Schéma du flagelle chez *E. coli* avec les différentes protéines flagellaires (D'après Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (<http://www.genome.ad.jp/kegg/>)).

La structure du flagelle est très complexe et son assemblage est un processus extrêmement bien régulé. L'ordre d'assemblage des différentes protéines flagellaires se fait de manière hiérarchisée allant de la partie proximale à la partie distale de la structure, c'est-à-

dire, en allant des composants de la membrane interne à ceux de la membrane externe pour terminer par ceux situés à l'extérieur de la bactérie, à savoir le « hook » et le filament.

2.1. Le corps basal

La première partie du flagelle qui se met en place est le corps basal. Cette partie est composée principalement de quatre anneaux protéiques distincts, d'une tige centrale creuse, d'un générateur de force motrice et d'un appareil d'exportation spécialisé.

2.1.1. Les anneaux protéiques

Les anneaux protéiques du corps basal sont au nombre de quatre : le C-ring dans la partie cytoplasmique de la bactérie, le MS-ring dans la membrane interne (M pour « membrane » et S pour « supramembrane »), le P-ring dans la couche de peptidoglycane et le L-ring dans la membrane externe (L pour « lipopolysaccharide ») (Figure 3).

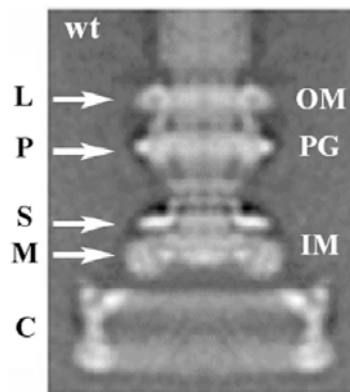


Figure 3: Reconstitution du corps basal à partir d'images en microscopie électronique ⁶.
OM : membrane externe, PG : peptidoglycane, IM : membrane interne, les lettres à gauche représentent les différents anneaux protéiques.

Le MS-ring et le C-ring, au niveau de la membrane interne bactérienne, interviennent dans la sécrétion des protéines, l'ancrage et la rotation du flagelle, tandis que le P-ring formé de monomères de la protéine FlgI et le L-ring formé de monomères de la lipoprotéine FlgH dans la partie supérieure du corps basal, ont un rôle structural principalement en isolant la tige centrale des constituants de l'enveloppe ¹⁵.

Le MS-ring est la toute première pièce à se mettre en place dans la membrane bactérienne lors de la formation du flagelle, et elle est à la base de la structure, de l'assemblage, et de la fonction flagellaire. Bien que l'on sache aujourd'hui qu'il s'agit d'un seul anneau constitué d'un assemblage de monomères de protéine FliF, l'apparence bimodulaire du MS-ring en microscopie électronique laissait penser que deux anneaux distincts (le M-ring et le S-ring) le constituait.

Le C-ring vient se fixer au MS-ring du côté cytoplasmique et est constitué de trois protéines distinctes : FliG, FliM et FliN. FliG participe à la rotation du flagelle et tient le rôle de « rotor » dans le moteur flagellaire, FliM intervient comme senseur pour la chaîne de transduction du signal extérieur et le rôle de FliN est encore inconnu.

2.1.2. L'appareil d'exportation flagellaire

Toute la structure flagellaire localisée au-delà de la membrane interne (exception faite pour le P-ring et L-ring) est assemblée à partir de protéines exportées par l'appareil d'exportation flagellaire. Cet appareil qui se fixe principalement à la base du corps basal est constitué de 3 protéines solubles (FliH, FliI, FliJ) et de protéines de la membrane interne (FlhA, FlhB, FliO, FliP, FliQ et FliR).

FliI est une ATPase qui fournit l'énergie nécessaire à l'exportation des protéines flagellaires. FlhA et FlhB ont un grand domaine cytoplasmique permettant sans doute la liaison de l'ATPase FliI, de son régulateur FliH et d'une chaperonne générale FliJ¹⁶ (Figure 4).

a.

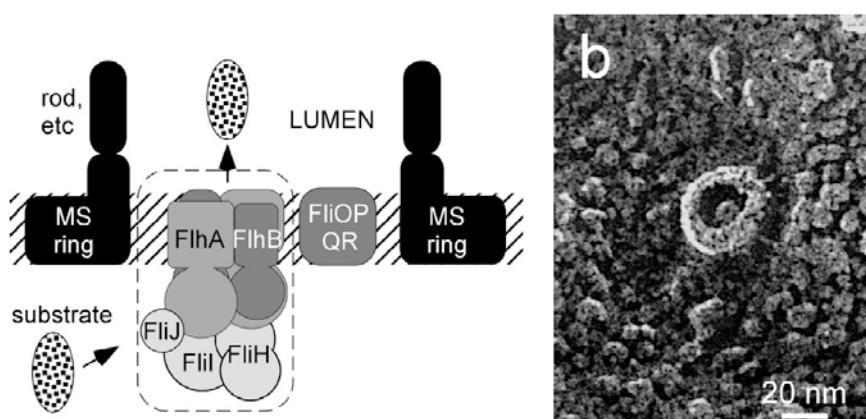


Figure 4 : a : Schéma de l'appareil d'exportation flagellaire (pas à l'échelle, le canal mesure 3nm et ne laisse passer qu'une seule molécule de substrat).
b : Micrographie en « Quick-freeze » montrant le C-Ring dans la face cytoplasmique et la « tige C » faisant partie de l'appareil d'exportation³.

À une ou deux exceptions près (FlgM et FliK détaillées plus tard), les protéines flagellaires exportées par ce système se retrouvent incorporées dans le flagelle. Ce système d'exportation est très similaire au système de sécrétion de type III. Ce dernier est généralement utilisé par les bactéries pathogènes gram négatives pour sécréter des facteurs de virulence.

Les monomères du P-ring (FlgI) et du L-ring (FlgH) possèdent un peptide signal et sont exportés dans le périplasme par le système Sec. FlgI possède une chaperonne périplasmique nommée FlgA qui protégera FlgI de la protéolyse¹⁷.

FliE est sans doute la première protéine à utiliser l'appareil d'exportation flagellaire lors de l'assemblage du flagelle¹⁸. Cette protéine spéciale du corps basal servirait peut-être de jonction entre le MS-ring et la tige centrale.

2.1.3. La tige centrale

La tige est divisée en deux parties : une partie distale formée par la protéine FlgG et une partie proximale formée par les protéines FlgB, FlgC, FlgF et FlgJ. FlgJ est une protéine particulière bifonctionnelle, elle possède une activité muraminidase permettant de digérer la couche de peptidoglycane et de créer un passage pour la formation de la tige, mais elle agirait aussi directement pour l'assemblage de la tige^{19, 20}. Formant un canal creux d'environ 3nm de diamètre qui traverse les membranes interne et externe, la tige assure la liaison entre l'espace cytoplasmique et l'extérieur de la bactérie. Ce canal permet le passage de protéines vers l'extérieur pour l'assemblage du « hook » et du filament.

L'énergie générée par les protéines MotA et MotB (voir ci-dessous) est transmise à la partie externe du flagelle par cette tige. La tige permet donc la transmission du mouvement rotatoire aux structures externes comme le « hook » et le filament.

2.1.4. Le générateur de force motrice : les protéines Mot

Le moteur flagellaire est constitué d'un « rotor » et d'un « stator ». Le « stator » est formé par les protéines Mot et le « rotor » par la protéine FliG du C-ring. Les protéines Mot génèrent une force proton-motrice en formant un canal à proton apportant l'énergie nécessaire à la rotation du flagelle²¹.

Chez les entérobactéries, MotA possède 4 segments transmembranaires et un domaine cytoplasmique tandis que MotB possède un segment transmembranaire et le reste de la protéine se trouve dans l'espace périplasmique. MotA et MotB sont agencés en couronne autour du MS-Ring et forment des complexes, probablement de type (MotA)₄(MotB)₂ si l'on compare avec leurs homologues chez *Vibrio alginolyticus*, PomA et PomB²². MotB aurait une fonction d'ancrage de la protéine MotA²³.

2.2. Le « hook »

Le « hook » ou coude est la première pièce du flagelle à émerger de la membrane externe de la bactérie et est à la base du filament.

Le « hook » possède une taille invariable de 55 nm de long et est formé de 130 sous-unités de protéines FlgE agencées en 11 fibrilles formant une structure moins rigide que le filament et qui peut transmettre, grâce à sa flexibilité, le mouvement généré de la tige au filament.

FlgD constitue la coiffe du « hook » lors de sa formation et permet de faire la transition avec la tige du corps basal. FlgK et FlgL sont les deux protéines de jonction entre le « hook » et le filament. Les propriétés mécaniques du filament et du « hook » étant différentes, FlgK et FlgL jouent le rôle d'adaptateur.

La mutation du gène *fliK* produit des « hook » plus grands en empêchant sa terminaison (« polyhook ») et la surexpression de FlgE augmente de façon impressionnante sa longueur

(« superpolyhook ») (Figure 5). Les protéines FliK, FlgK, et FlgL sont nécessaires pour obtenir une terminaison correcte de l'élongation du hook ¹¹.

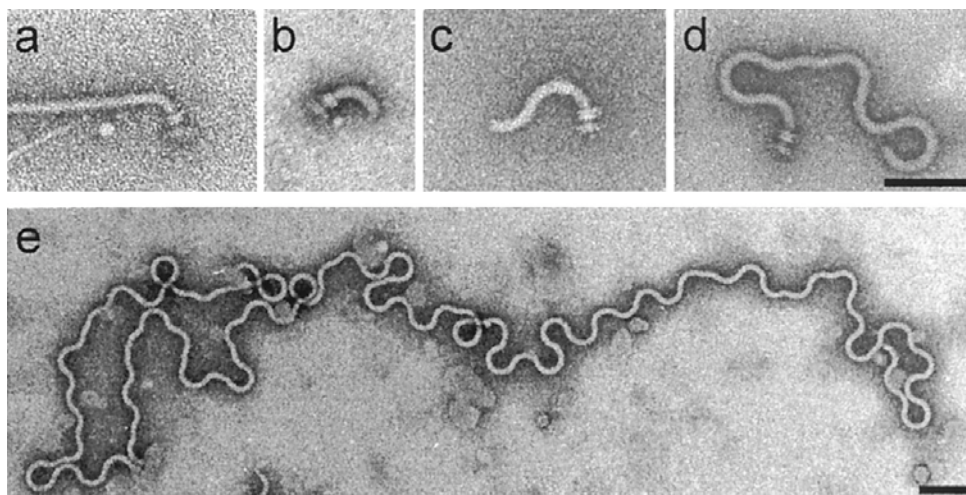


Figure 5 : Visualisation en microscopie électronique des effets de la surproduction de la protéine du « hook » chez *S. typhimurium* sauvage (a) et chez des mutants *fliD* (b), *flgL*(c), *flgK*(d) et *fliK*(e)

En a : « hook » normal avec filament, b : « hook » normal sans filament, c : élongation du « hook » sans filament, d : « polyhook » et en e : « superpolyhook » ¹¹.

2.3. Le filament

Le filament est très rigide chez certaines bactéries permettant à la cellule de se propulser dans son milieu environnant et représente en taille la majorité du flagelle.

Le filament a une longueur variable pouvant atteindre 15 μm , et possède un diamètre constant sur toute sa longueur d'environ 20 nm (entre 12 et 25 nm selon l'espèce bactérienne). Il est constitué de plus de 20.000 sous-unités de protéine FliC (aussi appelée « flagelline ») agencées en 11 protofilaments, et se termine par une coiffe composée de monomères de la protéine FliD. Le rôle de FliD et FliC dans l'adhérence du flagelle aux cellules a été démontré chez *Clostridium difficile* ²⁴.

La structure tridimensionnelle de la flagelline, déterminée par cristallographie, et l'étude complète du filament par des cartes de densités électroniques ont permis de mettre au point un modèle très précis du filament allant jusqu'à une résolution de 2 Å ⁷ (Figure 6).

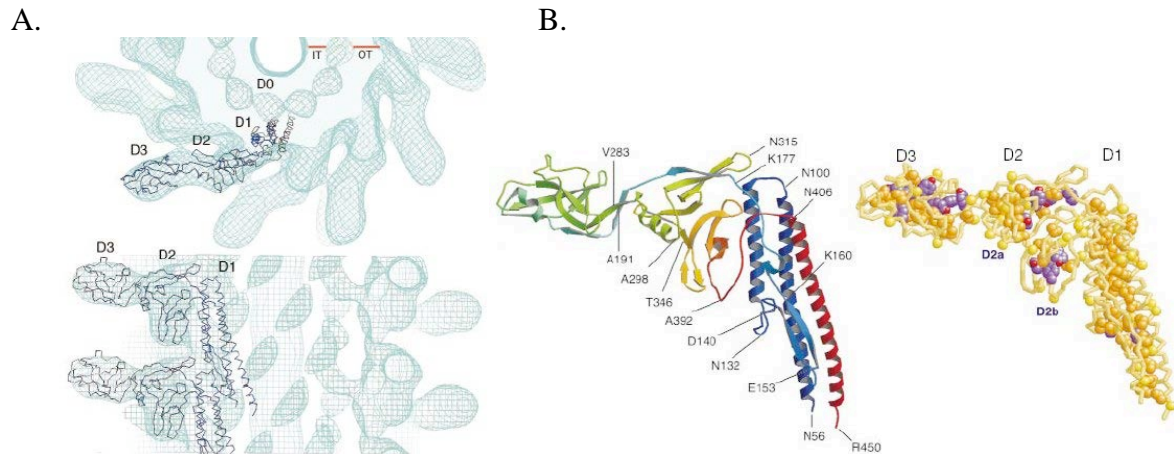


Figure 6: A : Superposition du modèle cristallographique de la flagelline avec les cartes de densité électronique du filament en section horizontale et verticale.

B : structure tridimensionnelle de la flagelline de *Salmonella* avec la localisation des différents domaines de la flagelline, D1, D2 et D3. ⁷

Selon le sens de rotation du flagelle, le filament prend une conformation différente. Lorsque le sens de rotation est anti-horloger, le filament devient très stable et se met à tourner « en tire-bouchon », ce qui propulse la bactérie en avant (phase de « swimming »). Par contre, lorsque le sens est horloger, la structure du filament est déstabilisée, il perd sa rigidité et la bactérie entre en phase de « tumbling » pour se réorienter. L'adaptation par la bactérie de l'une ou l'autre phase dépend de la présence de substances chémo-attractives détectées dans le milieu, et une alternance entre ces 2 phases et leur durée respective permet au microorganisme d'atteindre finalement l'environnement le plus adéquat.

3. La régulation de l'expression des gènes flagellaires chez les entérobactéries ⁴

La synthèse des constituants flagellaires et leur assemblage en flagelle est un système extrêmement bien régulé (Figure 7). Cette régulation s'observe à plusieurs niveaux : transcriptionnel, traductionnel et post-traductionnel.

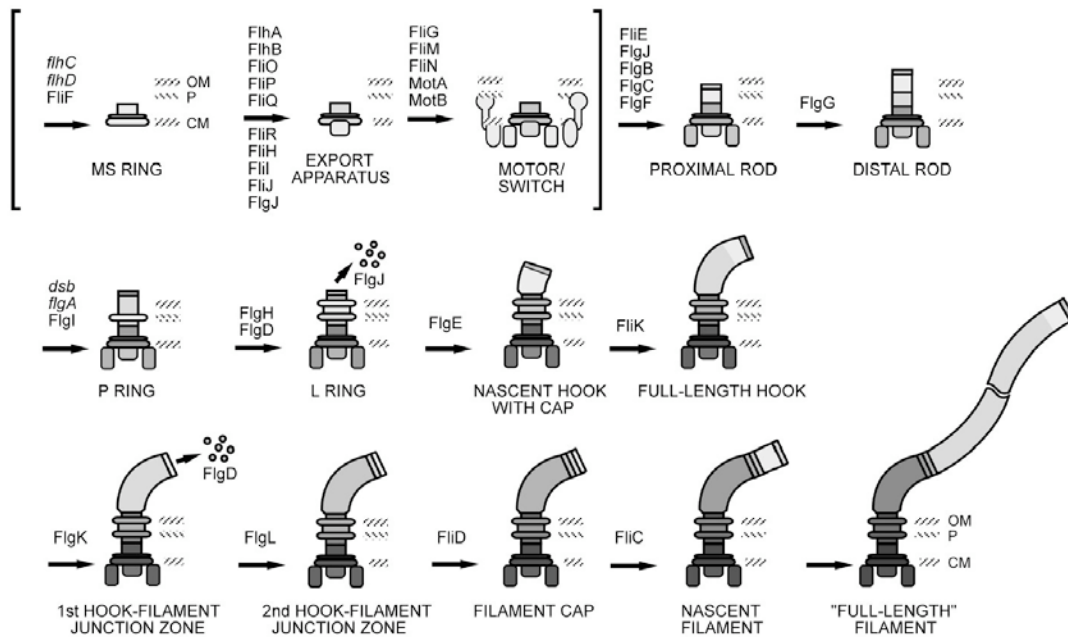


Figure 7: Assemblage du flagelle chez *S. typhimurium*.

Les parenthèses indiquent l'assemblage de la structure avant l'utilisation de l'appareil d'exportation flagellaire³.

La synthèse et la fonction du flagelle ainsi que le système du chémotactisme requièrent l'expression de plus de 50 gènes divisés en 15 opérons (*E. coli*) ou en 17 opérons (*S. typhimurium*) qui constituent le régulon flagellaire¹⁰ (Figure 8).

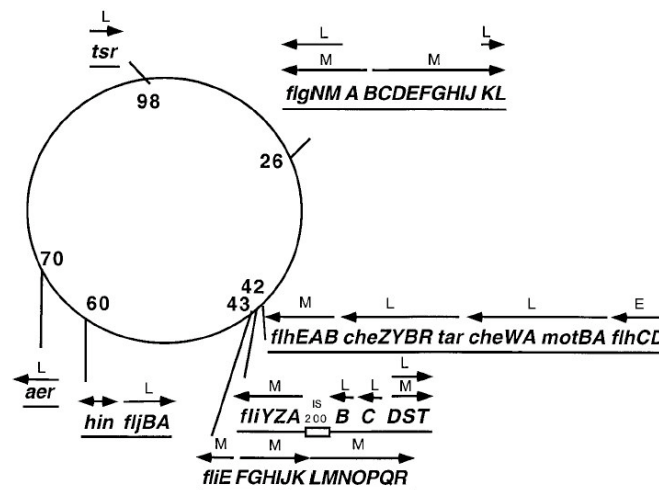


Figure 8 : Localisation chromosomique des opérons qui forment le régulon flagellaire chez *S. typhimurium*.

Les lettres E (« early » ou précoce), M (« middle » ou intermédiaire) et L (« late » ou tardif) déterminent le moment de leur induction lors de la biogenèse du flagelle¹⁰.

Au sein du régulon, les opérons sont divisés en trois classes transcriptionnelles, hiérarchisées et régulées temporellement : on parle des classes 1, 2 et 3 (pour les promoteurs) correspondant respectivement aux gènes précoces («early»), intermédiaires («middle») et tardifs («late»).

Les gènes précoces produisent des protéines régulatrices qui contrôlent l'expression du régulon entier. Les gènes intermédiaires produisent les composantes structurales du corps basal, du « hook », du système de sécrétion et des protéines régulatrices intervenant à la fin de l'assemblage du « hook ». Enfin, les gènes tardifs codent pour des protéines du filament, les protéines MotA et MotB, et l'appareil chémotactique. L'expression des opérons d'une classe de gènes ne s'effectue que si les gènes de la classe précédente ont été exprimés, ce qui permet une régulation par « feedback » (rétroaction) négatif et positif (Figure 9).

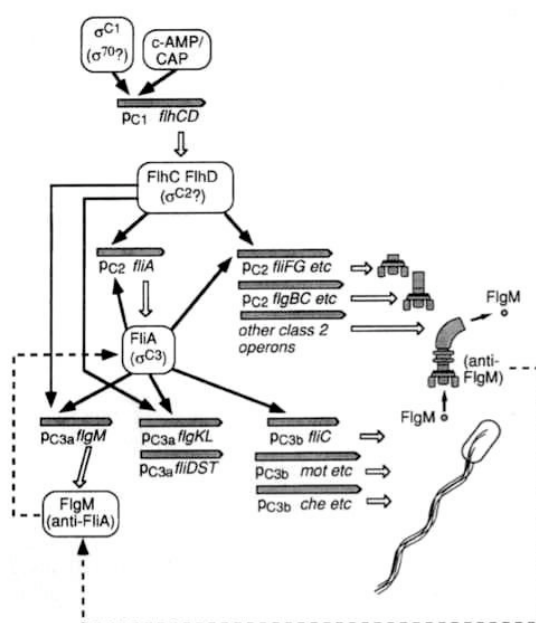


Figure 9 : Représentation schématique de la régulation de l'assemblage du flagelle chez *Salmonella typhimurium*².

Chez *Salmonella*, la terminaison de l'assemblage du corps basal et du « hook » est le principal point de contrôle pour la transcription des gènes nécessaires pour le reste de l'assemblage du flagelle.

Il a été montré, en utilisant des fusions transcriptionnelles promoteur-gfp chez *E. coli* que dans chaque classe hiérarchique, il existe un ordre concernant l'induction des différents promoteurs qui reflète l'assemblage des sous-unités individuelles²⁵.

3.1. L'opéron maître (opéron *flhDC*)

L'opéron *flhDC* est l'unique opéron de la classe 1 et est absolument nécessaire pour l'expression de tous les autres gènes flagellaires. Cet opéron se situe en effet au sommet de la hiérarchie de la régulation de la biogenèse flagellaire et les protéines FlhD et FlhC forment un hétéromultimère activant la transcription à partir des promoteurs de classe 2².

Cet opéron est notamment régulé par le complexe CAP (Catabolite Activator Protein)-AMP cyclique et par la protéine H-NS ²⁶.

Récemment, il a été montré qu'une protéase ClpXP dépendante de l'ATP est responsable de la dégradation des protéines FlhD et FlhC ²⁷. Il semblerait par ailleurs que cette protéase ClpXP dégrade uniquement le complexe FlhD₂FlhC₂ et non les protéines individuellement ²⁸. La concentration cellulaire en complexe FlhD₂FlhC₂ serait donc contrôlée à un niveau post-traductionnel par la protéase ClpXP.

3.2. Les facteurs S28 (FliA) et anti-S (FlgM)

Le gène *fliA* est sous la dépendance d'un promoteur de classe 2 et code pour la protéine FliA (S28) qui est un facteur S spécifique du flagelle intervenant dans l'expression des opérons de classe 3. Les promoteurs de classe 3 sont reconnus spécifiquement par l'ARN polymérase associée au facteur S28. Cependant, *flgK*, *flgL*, *flgM*, *flgN*, *fliD*, *fliS* et *fliT* sont transcrits à la fois par l'activation des promoteurs de classe 2 dépendant de FlhDC et par les promoteurs de classe 3 dépendant de S28.

FlgM est une protéine dite anti-S car elle se lie au facteur S28 et neutralise son activité, elle a donc un rôle d'inhibiteur à ce niveau. Lorsque l'expression des opérons de classe 3 est nécessaire, FlgM est excrétée de la bactérie par le flagelle en formation. S28 qui se retrouve alors libre est capable de se lier aux promoteurs des opérons de classe 3.

Il existe un contrôle concernant le moment de l'exportation et de l'assemblage de chaque protéine. L'exportation de la protéine FlgM se déroule au moment où le « hook » termine son assemblage, juste avant l'addition des protéines de jonction « hook »-filament et l'assemblage du filament.

3.3. Régulation par des protéines chaperonnes

Contrairement aux chaperonnes associées au système de sécrétion de type III au sens strict qui se lient à l'extrémité amino-terminale de leur partenaire, celles du système de sécrétion du flagelle se lient à la région carboxy-terminale ²⁹. Toutes les protéines intervenant après l'assemblage du corps basal et du « hook » possèdent leur chaperonne : FlgN pour les protéines associées au « hook » (FlgK et FlgL), FliT pour la coiffe du filament (FliD) et FliS pour la flagelline ³⁰. Seule FlgM ne possède pas de chaperonne définie.

Beaucoup de chaperonnes ont un rôle transcriptionnel ou traductionnel secondaire. Par exemple, FliT régule négativement l'activité des promoteurs de classe 2 et FlgN régule positivement la traduction des transcrits de classe 3 de *flgM* afin de garder une faible concentration cellulaire de protéines FlgM lorsque celle-ci est sécrétée pendant l'assemblage du « hook » ^{31, 32}.

À la fin de l'assemblage du flagelle, FlgN s'associe avec les protéines FlgK et FlgL qui s'accumulent dans la bactérie ce qui inhibe sa fonction traductionnelle sur les transcrits de classe 3 de *flgM*. La sécrétion de la coiffe du filament libère FliT. Lorsque FliT est libre dans la cellule, il exerce une régulation négative sur la transcription des gènes intermédiaires empêchant ainsi l'assemblage du corps basal et donc la compétition avec les gènes tardifs.

Lorsque l'assemblage du flagelle est terminé, les protéines de la coiffe du filament s'accumulent dans la cellule et s'associent de nouveau avec FlhT, restaurant ainsi l'expression des gènes encodant le corps basal. Cela a également pour effet d'augmenter la quantité de protéine FlgM, inhibant de ce fait l'activité du facteur σ^{28} et donc la transcription des gènes tardifs et permettant alors de nouveau la synthèse et l'assemblage d'un autre flagelle.

La traduction de FlgM provenant d'un transcrite de classe 3 est encore régulée par une autre protéine : la protéine Flk¹³. Flk est ancrée en membrane cytoplasmique et partage des similarités avec des facteurs d'initiation de la traduction suggérant un rôle dans l'initiation de la traduction des transcrits de classe 3 lors de l'achèvement du corps basal et du « hook ».

Un autre niveau de régulation de FlgM est l'incorporation du P-ring et du L-ring dans la structure flagellaire. Juste avant l'assemblage des P-ring et L-ring, le MS-ring inhibe directement ou indirectement la traduction de l'ARN messager de FlgM³³. Cette réduction de la traduction de FlgM diminue la quantité de la protéine dans la bactérie et libère le facteur σ^{28} , ce qui permet l'expression des gènes flagellaires de classe 3 (Figure 10).

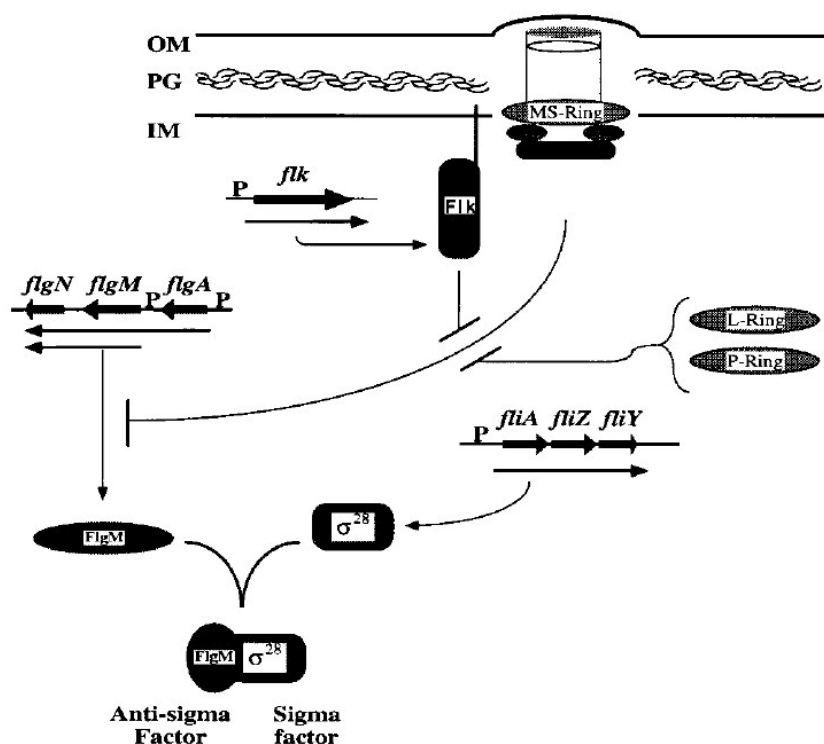


Figure 10 : Diagramme de la régulation de la traduction de l'ARN messager de *flgM* encodant l'anti-facteur σ^{28} ¹³.

4. Le flagelle chez les α -Protéobactéries

Bien que la structure du flagelle soit en général bien conservée, des différences peuvent apparaître au niveau de la régulation et de la structure entre les modèles étudiés chez les entérobactéries et les α -Protéobactéries qui nous intéressent. Parmi les α -Protéobactéries,

nous nous intéresseront à *C. crescentus* et *Sinorhizobium meliloti* (une bactérie symbiotique des plantes très proche phylogénétiquement de *Brucella*).

4.1. Le flagelle chez *C. crescentus*

C. crescentus est une bactérie aquatique présentant une division cellulaire asymétrique. Chaque division donne d'une part, une cellule flagellée mobile capable de nager mais ne pouvant pas se répliquer, et d'autre part une bactérie immobile possédant un « stalk » (pied) et capable de se répliquer. Après une durée de vie constante, la bactérie flagellée se différencie en cellule immobile en éjectant son flagelle et en synthétisant un « stalk » (figure 11).

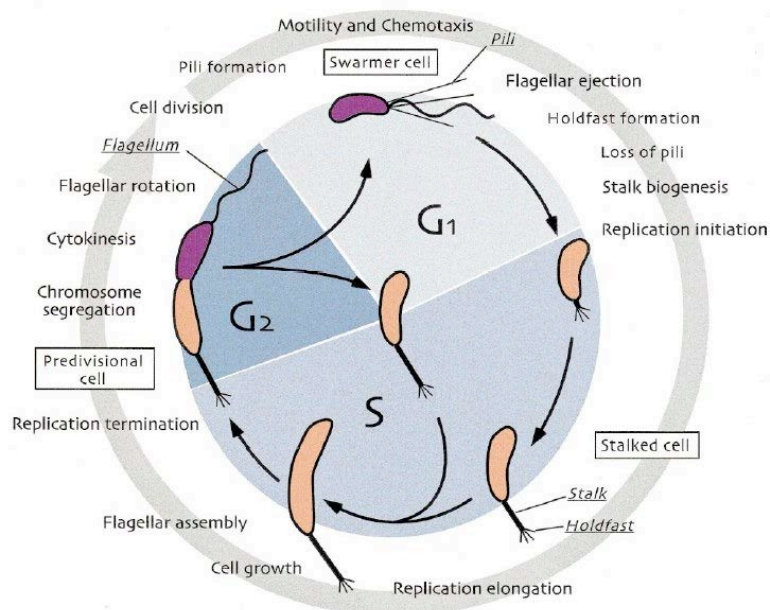


Figure 11 : Diagramme schématisé du cycle de *C. crescentus*¹.

Contrairement aux entérobactéries qui ne possèdent qu'un type de flagelline, *C. crescentus* possède trois types de flagelline ayant une masse moléculaire distincte et toute nécessaire à la mobilité. La flagelline la plus abondante est une protéine de 25 kDa, FljK.

Les deux autres flagellines sont encodées par les gènes *fljL* et *fljJ* et sont légèrement plus grosses (27.5kDa et 29kDa respectivement).

4.2. Le flagelle chez *Sinorhizobium meliloti*

L'appareil flagellaire de *S. meliloti* présente aussi des différences par rapport aux entérobactéries. Ces différences s'observent au niveau du système de transduction du signal du chemotactisme, du moteur flagellaire avec 2 protéines Mot supplémentaires, de la rotation flagellaire et de la structure du filament.

Le filament est composé d'hétérodimères de flagelline et ne tourne que dans le sens horloger. Le filament est constitué de 3 ou 4 sous-unités de flagellines différentes. FlaA est la flagelline principale, tandis que FlaB, FlaC et FlaD sont secondaires. FlaA et au moins une flagelline secondaire sont requises pour l'assemblage d'un filament fonctionnel³⁴.

Le flagelle de *S. meliloti* et *Rhizobium lupini* a une rotation qui propulse la cellule en avant, et son changement de direction résulte d'un changement dans la vitesse de rotation du filament. Au moment de la rotation à pleine vitesse, les filaments des flagelles forment un faisceau qui propulse la cellule dans une direction linéaire. Le « tumbling » est causé par une décélération asynchrone qui déstabilise les flagelles individuellement, et le faisceau de filaments qui propulse la cellule est alors dissocié³⁵ (Figure 12).

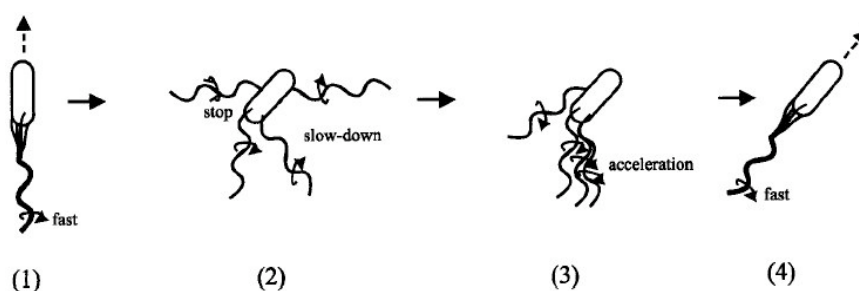


Figure 12 : Les différentes phases du mouvement de *Rhizobium lupini* : (1) le sens de rotation du flagelle est horloger et la bactérie avance, (2) : les flagelles décélèrent et la bactérie se réoriente, (3) : nouvelle accélération, (4) : la bactérie avance dans une autre direction⁵.

Ces variations de la vitesse de rotation du moteur flagellaire ont un corollaire moléculaire, 2 nouvelles protéines Mot, MotC et MotD, en plus des protéines MotA et MotB qui forment le canal à protons énergisant (Figure 13).

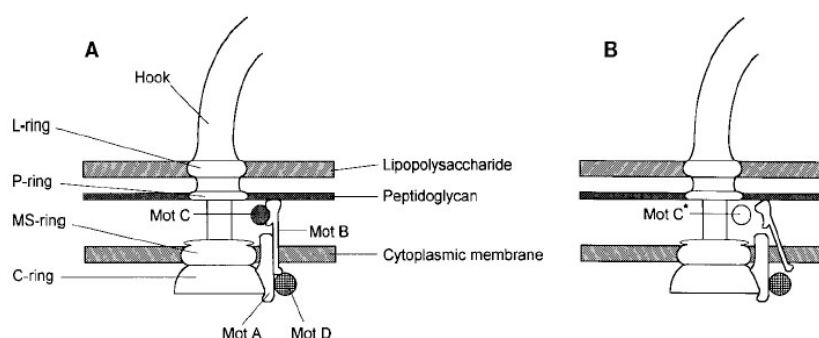


Figure 13: A. Représentation schématique de la localisation des protéines Mot chez *R. meliloti*
B. Représentation du système non fonctionnel après mutation de MotC⁸.

MotC est une protéine périplasmique qui interagirait avec la protéine cytoplasmique FliM du « rotor » et en fonction du système de transduction du signal chimotactique, déterminerait la vitesse de rotation ⁸.

5. La régulation de l'expression des gènes flagellaires chez les α -Protéobactéries

5.1. La régulation de l'expression des gènes flagellaires chez *C. crescentus*

Au point de vue de la régulation, contrairement à *S. typhimurium* qui ne possède qu'un point de contrôle majeur à l'étape de l'achèvement de la construction du corps basal et du « hook », *C. crescentus* possède deux points de contrôle, un premier après l'assemblage du MS-ring et du C-ring, et un second après l'assemblage du corps basal et du « hook » (Figure 14).

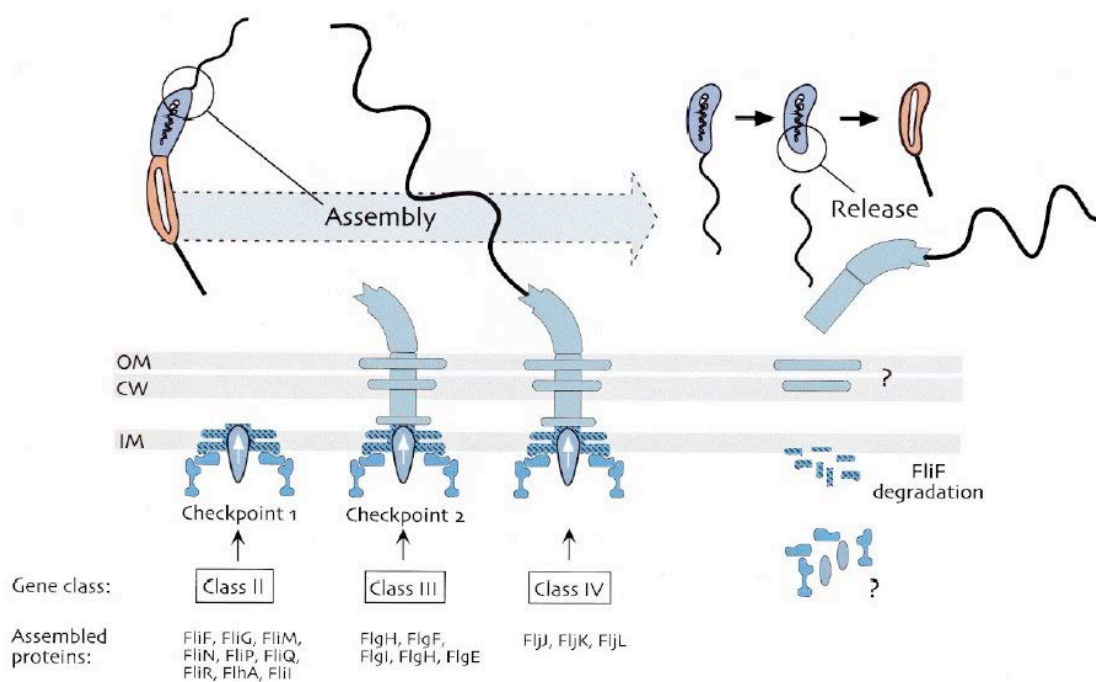


Figure 14 : Assemblage et éjection du flagelle polaire de *C. crescentus*. En haut : représentation de la bactérie, au milieu : représentation du flagelle, et en bas : gènes et protéines impliquées. OM : membrane externe, CW : peptidoglycane, IM : membrane interne ¹.

La présence de ces deux points de contrôle chez *C. crescentus* lors de la régulation permet de grouper les gènes flagellaires en quatre classes d'expression :

- 1) Les gènes de classe 1 codent pour des activateurs transcriptionnels.
- 2) Les gènes de classe 2 encodent le MS-ring et le C-ring.
- 3) Les gènes de classe 3 encodent la tige, le « hook », les protéines associées au « hook » et les protéines de la coiffe du filament
- 4) Les gènes de classe 4 encodent la flagelline.

Il n'y a que 3 classes de promoteurs car les gènes de classes 3 et 4 sont exprimés à partir de promoteurs dépendant du facteur S54 et des régulateurs FlbDE.

5.1.1. Transcription des gènes de classe 2

Les promoteurs de classe 2 sont reconnus in vitro par le complexe facteur S73-ARN polymérase.

Le régulateur de réponse CtrA (classe 1) est impliqué dans le contrôle du cycle cellulaire, de la réplication de l'ADN et de sa méthylation³⁶. CtrA serait phosphorylé par la kinase CckA et CtrA phosphorylé (CtrA-P) active la transcription des gènes de classe 2. Il est nécessaire à l'initiation de la transcription de *fliF* montrant que ce régulateur coordonne le cycle cellulaire et l'expression du flagelle³⁷.

5.1.2. Transcription des gènes flagellaires de classes 3 et 4

La transcription des gènes flagellaires de classes 3 et 4 nécessite la présence d'un facteur S alternatif, S54 codé par le gène *rpoN*, dont l'expression varie au cours du cycle cellulaire. Chez beaucoup de bactéries, S54 est impliqué dans la régulation métabolique. Chez *C. crescentus* il régule l'assemblage du flagelle et la formation du « stalk ».

Les protéines régulatrices FlbD et FlbE forment un système à deux composants nécessaire pour la transcription des gènes de classes 3 et 4 et *flbDE* se trouvent dans l'opéron de *fliF*.

FlbD serait le régulateur de réponse de ce système et est homologue à la protéine NtrC chez *E. coli*. FlbE possède un domaine histidine kinase des systèmes à deux composants et phosphoryle un résidu aspartate de FlbD³⁸.

FlbD phosphorylé inhibe le facteur S73, ce qui inhibe l'expression des gènes de classe 2 et par la même occasion, sa propre synthèse, et active le facteur S54, activant l'expression des gènes de classe 3 et 4.

Juste avant la division, FlbE se concentre à la base du stalk et au niveau du septum lors de la division (Figure 15). La partie N terminale de la protéine interagit avec un composant du septum ou de la biogenèse du stalk. Des études sur FlbE ont montré que la transcription des gènes de classes 3 et 4 est couplée au cycle de division cellulaire pour l'assemblage du flagelle³⁹.

L'expression de FlbD est également sous le contrôle du cycle cellulaire et sa forme phosphorylée ne se retrouve que dans la cellule flagellée au moment où elle synthétise son flagelle.

5.1.3. Traduction de la flagelline

A l'inverse des entérobactéries, il n'y a pas de couple S (S28)-anti S (FlgM) impliqué dans la régulation flagellaire de *C. crescentus*. Par contre, un autre gène flagellaire joue un rôle important lors de la régulation, il s'agit du gène *flbT*⁹ (Figure 16).

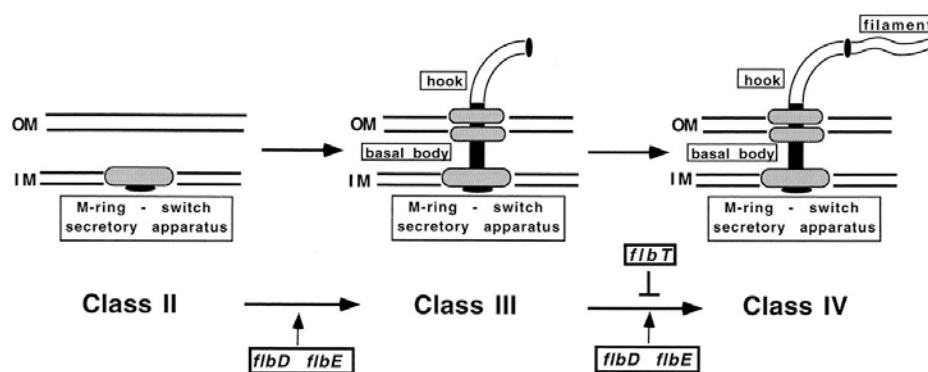


Figure 16 : Schéma de la hiérarchie dans la régulation flagellaire chez *C. crescentus* montrant l'inhibition de l'expression de la flagelline en l'absence du complexe corps basal-« hook »⁹.

FlbT est un inhibiteur de l'expression de la flagelline. Il déstabilise l'ARN messager d'au moins une flagelline, FljK en s'associant à l'extrémité 5' non traduite (UTR) de cet ARNm, qui forme une structure en boucle⁴⁰. L'assemblage du corps basal et du « hook » est nécessaire pour la traduction d'au moins une des flagellines (classe 4) car il s'accompagne de la stabilisation des transcrits de flagelline par un mécanisme inconnu.

5.1.4. Éjection du flagelle

A un moment donné la cellule flagellée éjecte son flagelle et le remplace par un stalk. La dégradation de FliF est le premier événement qui coïncide avec l'éjection du flagelle⁴¹.

Cette dégradation est contrôlée par un système de transduction du signal à 2 composants impliquant PleD et PleC⁴¹.

PleD est un régulateur de réponse particulier qui possède deux domaines receveur à l'extrémité N terminale et un domaine inhabituel de fonction inconnue à l'extrémité C terminal⁴². Un seul des domaines receveurs possède un site de phosphorylation prédit.

5.2. La régulation de l'expression des gènes flagellaires chez *Sinorhizobium meliloti*

Sinorhizobium meliloti possède plus de 40 gènes intervenant dans le chimotactisme, la mobilité, l'assemblage et la fonction du flagelle. Ces gènes sont tous rassemblés en 1 locus et forment un régulon flagellaire. L'étude de la cascade d'expression flagellaire est à ses débuts chez *S. meliloti*. Les résultats de l'équipe de Schmitt indiquent l'existence de 3 classes de gènes flagellaires. Les gènes de classe 1 correspondent à l'opéron maître encodant les régulateurs transcriptionnels de la famille LuxR, VisN et VisR. Ces régulateurs formeraient un hétérodimère, VisNR, qui active la transcription des gènes flagellaires de classe 2⁴³.

Les protéines de la famille LuxR possèdent un domaine de liaison à un ligand et un domaine de liaison à l'ADN. Comme LuxR, on suppose que VisNR nécessite la liaison à un effecteur pour être fonctionnel. L'identification de ce ligand est compliquée par le fait que la structure des sites de liaison au ligand est différente chez VisN et VisR.

Les gènes de classe 2 sont divisés en 2 sous-groupes : les gènes intervenant dans l'assemblage du flagelle font partie du sous-groupe 2A (FliM du corps basal, et Orf38 de fonction inconnue) et les gènes *motA*, *motB* et *motC* du sous groupe 2B. Contrairement à la

classe 2A, les gènes de classe 2B ne sont pas nécessaires à l'expression des gènes de classe 3. La classe 3 est représentée par les gènes de la flagelline et du chémotactisme.

6. *Brucella melitensis*

6.1. Description de *Brucella*

Brucella est un coccobacille à gram négatif d'environ 1µm de long et 0,5 µm de large. Cette bactérie est un pathogène intracellulaire facultatif des cellules phagocytaires professionnelles et non professionnelles.

Les bactéries du genre *Brucella* sont responsables d'une zoonose mondialement répandue pouvant atteindre pratiquement toutes les espèces sauvages ou domestiques. Par exemple, la brucellose animale chez le bovin provoque l'avortement chez la femelle gestante et des orchites et épидidymites pouvant mener à la stérilité chez le mâle.

L'étude de *Brucella* est donc d'un intérêt économique mondial important mais concerne également un problème de santé publique dans certains pays. Le genre *Brucella* est constitué de 6 espèces dont 4 sont pathogènes pour l'homme : *Brucella melitensis*, *Brucella abortus*, *Brucella suis* et plus rarement *Brucella canis*.

Lorsque *Brucella* fut découverte en 1887 par le médecin anglais, Sir David Bruce, la brucellose était connue sous le nom de « Fièvre de Malte » contaminant à l'époque les soldats britanniques stationnés sur l'île de Malte. Depuis sa découverte, *Brucella* est connue pour être non mobile.

En se basant sur le séquençage de l'ARN ribosomique 16S, le genre *Brucella* est classé dans la sous-division des α -Protéobactéries qui regroupe notamment des bactéries intracellulaires ou péricellulaires, pathogènes ou symbiontes de plantes (*Agrobacterium* et *Rhizobioaceae*) ou d'animaux (*Brucella*, *Bartonella* ou *Rickettsia*).

Le génome de *Brucella melitensis* est constitué de 2 chromosomes circulaires de 1.15Mb et 2.1Mb.

La séquence des génomes de *Brucella melitensis* 16M et de *Brucella suis* 1330 est disponible depuis 2002^{44, 45}.

6.2. La brucellose humaine ou fièvre de Malte

La Brucellose peut atteindre occasionnellement l'homme par contact avec des animaux d'élevage infectés ou par ingestion de produits laitiers contaminés (lait cru, fromages frais) provenant de ceux-ci. Dans nos pays occidentaux, le personnel de laboratoire étudiant la bactérie, les agriculteurs, les vétérinaires et le personnel d'abattoir sont les principaux sujets à risque. La pénétration de la bactérie dans son hôte se fait par ingestion ou par voie cutanéomuqueuse puis elle envahit le système lymphatique.

Les premiers signes cliniques de la brucellose humaine sont peu spécifiques et se traduisent principalement par de la fièvre, des frissons, des sueurs, des douleurs musculaires et articulaires, de l'anorexie et parfois par une dépression nerveuse, bien que la maladie soit asymptomatique dans un cas sur deux⁴⁶.

La brucellose humaine se déclare généralement après 5 à 30 jours d'incubation et les premiers symptômes peuvent se compliquer en une phase chronique avec des problèmes ostéoarticulaires, neuroméningés, hépatiques, cardiaques ou du système reproducteur.

Le traitement habituel recommandé par l'Organisation Mondiale de la Santé est une antibiothérapie de doxycycline combinée à la streptomycine ou à la rifampicine, aucun vaccin efficace n'est encore disponible à ce jour pour la brucellose humaine. Dans 5% des cas le traitement aux antibiotiques est inefficace.

Le passage à l'homme représente une impasse épidémiologique puisque la brucellose humaine n'est pas contagieuse, ce qui traduit une adaptation imparfaite à l'homme ⁴⁷.

Les inconvénients engendrés par la maladie en font une arme bactériologique potentielle pour le bioterrorisme. *Brucella suis* fut d'ailleurs le premier organisme pathogène transformé en arme bactériologique par l'armée américaine dans les années 50 ⁴⁵.

6.3. Trafic intracellulaire de *Brucella*

L'adhérence de *Brucella* à la cellule cible est encore méconnue. *Brucella* infecte la cellule en entrant via phagocytose et se multiplie dans un compartiment qui lui est propre après avoir modifié le processus de maturation du phagosome.

Le trafic intracellulaire semble varier selon les types de cellules étudiées mais de manière générale, *Brucella* inhibe la fusion phagosome-lysosome et dans les cellules HeLa se retrouve dans une vacuole ayant des caractéristiques du réticulum endoplasmique qui constitue sa niche de réplication ¹² (Figure 17).

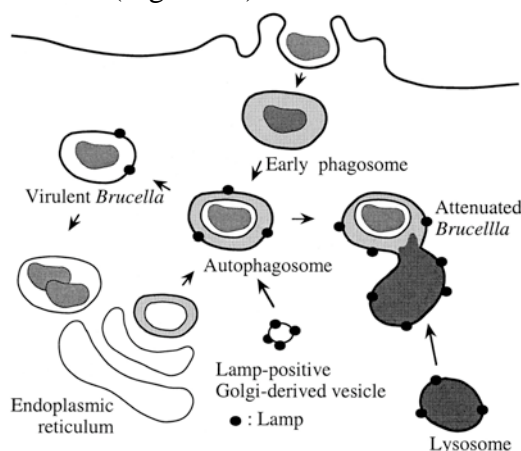


Figure 17 : Modèle représentant le trafic intracellulaire de *Brucella* dans les cellules HeLa ¹².

6.4. Les facteurs de virulence chez *Brucella*

Certains facteurs de virulence comme le système de régulation à deux composants BvrR/BvrS, la chaîne O du lipopolysaccharide, ou le système de sécrétion de type IV ont été identifiés chez *Brucella*. L'analyse des séquences génomiques confirme que *Brucella* ne possède pas de facteur de virulence classique tels que des exotoxines, une capsule, ou un plasmide de virulence.

Le système de régulation à deux composants BvrR/BvrS chez *Brucella* est homologue au système ChvI/ChvG chez *Agrobacterium tumefaciens* et ChvI/ExoS chez *Sinorhizobium meliloti* qui sont nécessaires respectivement à la pathogénicité et à la symbiose de ces bactéries chez les plantes. Le système BvrR/BvrS contrôle l'invasion cellulaire et la survie des bactéries dans la cellule en agissant sur les changements de l'enveloppe nécessaires au transit entre les milieux extracellulaire et intracellulaire^{48, 49}.

L'étude de mutants rugueux (dépourvus de chaîne O) génétiquement caractérisés a permis de démontrer que la chaîne O du lipopolysaccharide est impliquée dans la virulence de *Brucella*.

Le système de sécrétion de type IV VirB de *Brucella* est nécessaire à la virulence dans tous les modèles d'infections étudiés. Il intervient au moins dans le trafic intracellulaire de *Brucella*. Ce système est homologue au système VirB d'*Agrobacterium tumefaciens* et au système Ptl de *Bordetella pertussis*, qui sont nécessaires pour le transfert du plasmide Ti dans la cellule de plante infectée et pour la sécrétion de la toxine pertussique respectivement. La recherche d'effecteurs sécrétés par ce système chez *Brucella* est en cours. L'expression de ce système de type IV est activée par le régulateur transcriptionnel VjbR qui fait partie de la famille LuxR⁵⁰.

6.5. Les gènes flagellaires chez *Brucella*

Depuis sa découverte en 1887, *Brucella* est décrite comme non mobile et non flagellée.

En 1998, Shirley Halling découvre 3 homologues de gènes flagellaires chez *Brucella abortus* (*fliF*, *flgE* et *fliC*) qui se retrouvent chez toutes les espèces de *Brucella* et dans chaque biovar⁵¹.

Depuis lors d'autres homologues de gènes flagellaires ont été décrits chez *Brucella* au laboratoire et le séquençage des génomes a mis à jour 31 CDS flagellaires⁵². Tous ces gènes sont regroupés en 3 clusters sur le petit chromosome et leur organisation (ordre dans un cluster) est très semblable à celle de leurs homologues chez *Sinorhizobium meliloti* et de *Mesorhizobium loti*.

Ces CDS flagellaires sont nécessaires pour la synthèse de l'appareil de sécrétion, de la structure flagellaire et du moteur. On remarque ainsi que *Brucella* possède tout le matériel génétique pour synthétiser un flagelle capable de rotation. Néanmoins, aucun gène encodant l'appareil de chimotactisme n'a été identifié.

L'expression des protéines du hook (FlgE) et de la flagelline (FliC) a été montrée en milieu bactériologique riche en phase de latence chez *Brucella melitensis*. Par contre chez un mutant transpositionnel du gène *fliF* (encodant le MS ring), on ne détecte pas l'expression de ces 2 protéines suggérant une expression concertée des gènes flagellaires comme c'est décrit pour les autres bactéries étudiées : l'expression de FliF serait nécessaire à l'expression des protéines situées le plus à l'extérieur de la structure flagellaire, FlgE et FliC.

De plus *Brucella* possède des gènes que l'on ne retrouve que chez les α -Protéobactéries comme les gènes *motC* et *motD* étudiés chez *Rhizobium* et *flbT* chez *Caulobacter crescentus*.

Cependant, *Brucella* diffère des autres Rhizobiacées par le fait qu'elle ne dispose que d'un seul type de flagelline (une seule CDS pour la flagelline), et de trois loci flagellaires (un seul chez les autres bactéries citées précédemment) (Figure 18).

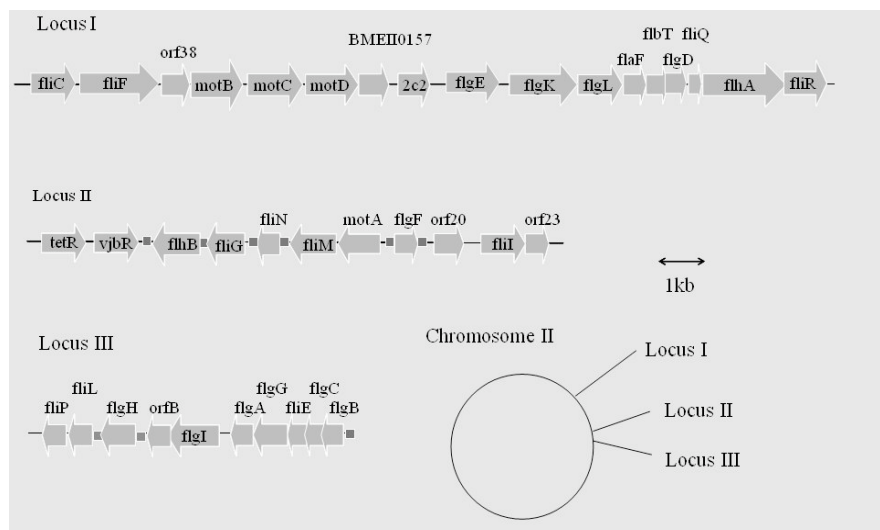


Figure 18 : Représentation de la localisation des 3 loci flagellaires et des différents gènes flagellaires dans le génome de *Brucella melitensis* 16M⁵⁰.

De plus, *Brucella* est la seule bactérie qui exprime des CDS flagellaires et qui ne possède aucun système du chémotactisme ce qui signifie que son flagelle potentiel ne servirait pas à la mobilité dirigée à travers un gradient de substance chemotactique⁵².

Un mutant transpositionnel de *fliF* de *B. melitensis* a été identifié au laboratoire comme atténué chez les souris BALB/c lors d'un crible STM⁵³.

Ce mutant est également atténué en macrophages et en cellules HeLa⁵⁴. D'autres mutants flagellaires ont été construits et sont également atténués chez la souris BALB/c (*motB*, *flgI*, *flhA*, *flgE*, *fliC*)⁵². L'étude de la fonction des gènes flagellaires lors des étapes de l'interaction avec la cellule eucaryote comme l'adhésion, la pénétration et le trafic intracellulaire est en cours (C. Nijskens thèse en cours).

Objectifs du mémoire

Brucella est habituellement décrite comme étant non mobile et non flagellée, mais les données du séquençage du génome de *B. suis* et *B. melitensis* ont mis à jour récemment 31 gènes flagellaires répartis en 3 loci chez cette bactérie^{51, 52, 44, 45}. Tout le matériel génétique nécessaire pour synthétiser un flagelle fonctionnel est présent, néanmoins on ne retrouve pas de système de chimotactisme. Des données obtenues au laboratoire mettent en évidence l'expression de plusieurs gènes flagellaires et leur implication dans la virulence de la bactérie⁵⁴, (J. Godfroid communication personnelle).

Les protéines FlgE (monomère du « hook ») et FliC (flagelline) sont exprimées et le promoteur de *fliF* (MS-ring) est induit en phase de latence (et début de phase exponentielle) lors d'une culture liquide en milieu riche.

La restriction de l'expression de ces gènes à une courte période montre l'existence de systèmes de régulation enclenchant et arrêtant la cascade d'expression. De plus, l'absence d'expression de FlgE et FliC dans un mutant *fliF* indique un niveau supplémentaire de régulation⁵², l'expression est dite concertée.

On ne connaît rien chez *Brucella* de la régulation transcriptionnelle de l'expression des gènes flagellaires, hormis un résultat préliminaire montrant que le gène *2c2* situé dans un locus flagellaire et encodant un régulateur transcriptionnel est nécessaire à l'induction du promoteur de *fliF* (S. Léonard thèse encours).

Le premier objectif de notre travail est de confirmer l'implication de *2c2* dans la régulation flagellaire, mais également d'analyser le rôle de deux autres gènes présents dans les loci flagellaires, *vjbR* (un régulateur transcriptionnel de la famille LuxR) et *tetR* (un régulateur transcriptionnel de la famille TetR).

Des mutants de *B. melitensis* 16M étant disponibles au laboratoire pour les gènes *2c2*, *tetR* et *vjbR*, une étude de l'activité du promoteur de *fliF* sera réalisée le long d'une courbe de croissance au moyen du système rapporteur *pfliF-lacZ* comparativement à la souche sauvage.

L'expression des protéines FlgE et FliC sera également analysée en parallèle par western blotting en utilisant des polysérums spécifiques de ces protéines.

Notre deuxième objectif est de réaliser des constructions plasmidiques, dont deux serviront à compléter les mutants *2c2* et *fliF* afin d'établir si les phénotypes particuliers de ces mutants sont dus à la seule mutation des gènes considérés. Une troisième construction sera réalisée dans le but de surexprimer la protéine *2c2* pour disposer d'une forme purifiée de celle-ci, destinée à des expériences ultérieures.

Notre troisième expérience visera à rechercher la présence d'appendice flagellaire à la surface de *Brucella*. Elle consistera à observer au microscope électronique à transmission des *B. melitensis* 16M colorées négativement après avoir été cultivé dans les conditions d'expression des gènes flagellaires.

Résultats et discussions

1. Recherche de régulateurs de l'expression du flagelle

Le flagelle bactérien est une structure extrêmement complexe. L'assemblage du flagelle et le système chémotactique impliquent une dépense d'environ 1 % de l'énergie de la cellule². Pour éviter un coût d'énergie trop important que nécessiterait la production constitutive de flagelles, le système flagellaire est finement régulé à plusieurs niveaux.

Après la découverte des trois loci flagellaires chez *B. melitensis*, les expériences au laboratoire ont montré une induction de FliC (flagelline) et de FlgE (monomère du « hook ») en phase de latence suivie d'une disparition de celles-ci en phases exponentielle et stationnaire⁵². De plus, l'absence d'expression de ces protéines par une souche mutée dans le gène *fliF* (MS-ring) a été mise en évidence, démontrant que l'expression de FlgE et FliC est dépendante de l'expression de FliF⁵⁵.

Ces données indiquent la présence d'un régulon flagellaire chez *Brucella*. Des régulateurs transcriptionnels potentiels ont été identifiés dans les loci flagellaires du génome de *B. melitensis* 16M. Il s'agit des gènes *2c2*, *tetR* et *vjbR*. Le rôle de ces 3 régulateurs potentiels (*2c2*, *VjbR* et *TetR*) dans l'expression des gènes flagellaires sera donc testé. *2c2* est localisé dans le locus flagellaire I et *tetR* et *vjbR* à l'extrémité du locus III.

L'organisation des gènes du régulon flagellaire de *Brucella* est très conservée par rapport à celle de *S. meliloti*. Chez *S. meliloti* deux gènes encodant des régulateurs transcriptionnels ont été détectés aux positions correspondant à *tetR* et *vjbR*, il s'agit de *visN* et *visR* appartenant à la famille LuxR et intervenant comme gènes de classe I chez *S. meliloti*. Le gène *2c2* qui se trouve dans le locus flagellaire I a montré une homologie avec des régulateurs de systèmes à deux composants lors d'un alignement de séquences et l'on retrouve également un gène homologue dans le locus flagellaire de *S. meliloti*.

Le système à deux composants est le principal moyen de transduction du signal utilisé chez les bactéries (Figure 1b). Ce système se retrouve également chez les eucaryotes. En général, le système est constitué d'un senseur disposant d'une fonction histidine kinase et d'un receveur représenté généralement par un régulateur transcriptionnel. Lorsque le senseur détecte un signal, son domaine histidine kinase transfère un phosphate à un aspartate généralement très conservé sur le receveur. De part cette phosphorylation, le régulateur change de conformation et son affinité augmente pour une séquence cible de liaison à l'ADN. Les régulateurs à deux composants possèdent ainsi un domaine de phosphorylation et un autre domaine possédant le motif « Helix-turn-helix » qui se lie à l'ADN.

Dans les régulateurs de réponse, l'aspartate 57 habituellement très conservé est la cible d'une phosphorylation. Dans *2c2*, l'aspartate 57 est remplacé par un résidu glutamate (Figure 1a). *2c2* est de ce fait considéré comme un régulateur atypique de la famille des deux composants. Habituellement les couples senseur-régulateur des systèmes à deux composants sont proches l'un de l'autre dans le génome or, *2c2* n'est pas voisin d'un gène encodant un senseur. Chez *B. melitensis*, 10 à 12 systèmes à deux composants putatifs pour lesquels

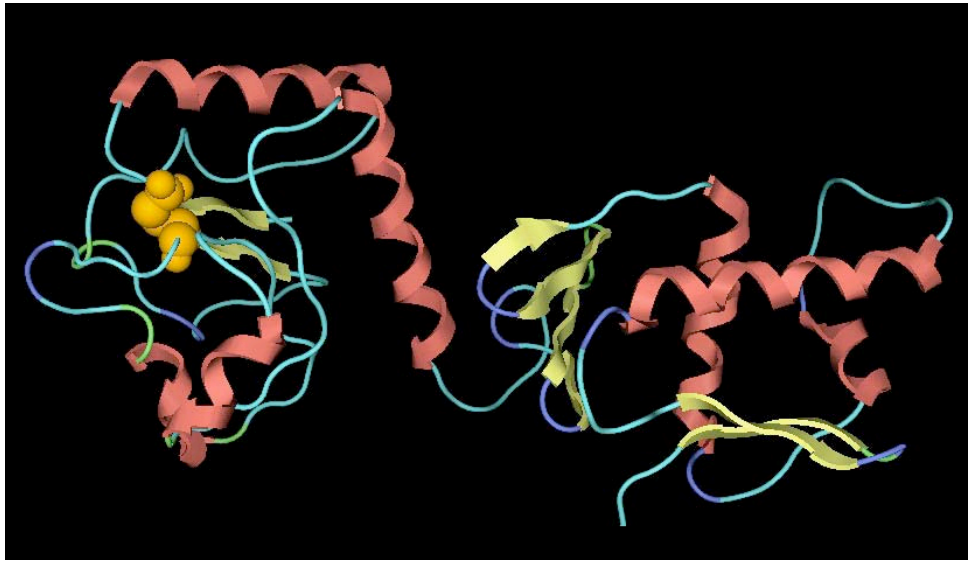


Figure 1a : Structure prédite de la protéine 2c2 montrant le glutamate en position 57 en orange. On observe aussi le domaine receveur à gauche et le domaine de liaison a l'ADN à droite.

senseur et régulateur sont voisins ont été proposés ainsi que 11 et 10 gènes encodant respectivement des régulateurs et des senseurs orphelins.

Afin de tester l'implication potentielle des 3 régulateurs dans l'expression flagellaire chez *B. melitensis* 16M, nous travaillerons avec 3 souches mutées chacune dans un gène de régulateur (les souches *2c2*, *vjbR* et *tetR*) et en parallèle avec la souche sauvage parentale *B. melitensis* 16M. Par ailleurs, connaissant l'organisation hiérarchisée de la régulation flagellaire chez d'autres espèces bactériennes, il nous a semblé intéressant de tester chez *B. melitensis* 16M l'implication des trois régulateurs d'intérêt à différents niveaux de la structure flagellaire.

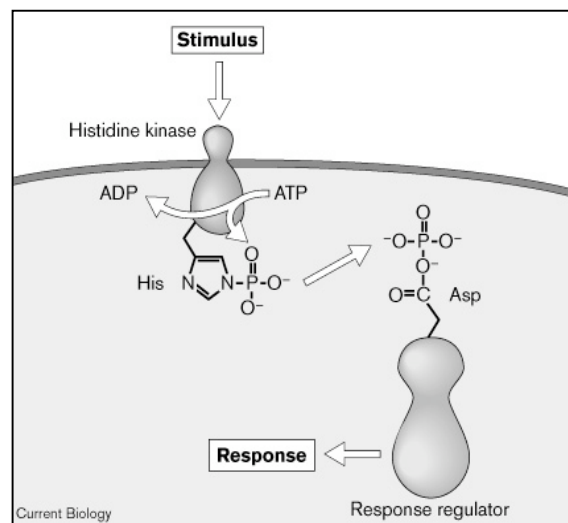


Figure 1b: Schéma des systèmes de transduction du signal à deux composants ⁵⁵.

Une première approche concerne le gène *fliF* encodant un élément situé à la base de l'appareil flagellaire, le MS-ring. Nous avons choisi d'étudier l'expression de *fliF* au niveau transcriptionnel en utilisant comme outil une fusion entre le promoteur de *fliF*, (*pfliF*) et le gène rapporteur *lacZ*. Une seconde approche concerne les gènes *flgE* et *fliC*, encodant respectivement les monomères du « hook » et du filament du flagelle. Leur expression sera suivie au niveau traductionnel, grâce à des polysérums spécifiques. Les protéines FlgE et FliC seront détectées en « western blotting ».

1.1. Étude de l'activité du promoteur de *fliF* dans les mutants *2c2*, *tetR* et *vjbR* comparativement à la souche sauvage

1.1.1. Introduction

Pour étudier l'activité transcriptionnelle de *pfliF*, une construction plasmidique portant une fusion entre la région promotrice de *fliF* (*pfliF*) et le gène *lacZ* a été utilisée (S.Léonard thèse en cours). Pour rappel, le gène *lacZ* code pour la b-galactosidase (b-Gal) dont l'activité

est facilement quantifiable par dosage. L'activité de *pflif* est donc quantifiée par dosage de la b-Gal en présence du substrat ONPG.

Rappelons que le gène *fliF* code pour la protéine FliF formant le premier anneau du corps basal, le MS-ring, strictement nécessaire à la formation du flagelle.

L'utilisation du système rapporteur *pflif-lacZ* dans la souche sauvage *B. melitensis* 16M a montré qu'une induction de l'activité de *pflif* se manifeste en phase de latence jusqu'au début de la phase exponentielle de croissance en milieu bactériologique riche.

Le but de ce travail a été de mesurer l'activité b-Gal dépendant du promoteur de *fliF* au cours d'une courbe de croissance dans la souche sauvage et dans les mutants *2c2*, *tetR* et *vjbR*.

1.1.2. Résultats

Le plasmide pBBR1MCS réplcatif chez *Brucella* portant la fusion *pflif-lacZ* et encodant la résistance au chloramphénicol a été introduit par conjugaison dans les souches sauvage et mutantes. Une culture de chaque souche a été réalisée dans du milieu riche 2YT avec un ensemencement initial à une DO_{600nm} de 0,05.

Des échantillons ont été prélevés tout au long de la croissance à différents points correspondant à la phase de latence, à la phase exponentielle, et à la phase stationnaire. Des dosages de l'activité b-Gal ont été réalisés sur ces échantillons (partie « matériel et méthodes ») pour détecter l'activité du *pflif* chez la souche sauvage et chez les trois mutants. Les dosages ont été réalisés en triplicat sur toutes les souches pour calculer la moyenne et l'écart-type. L'activité de la b-Gal est exprimée sous forme d'unités Miller⁵⁶ (Figure 2).

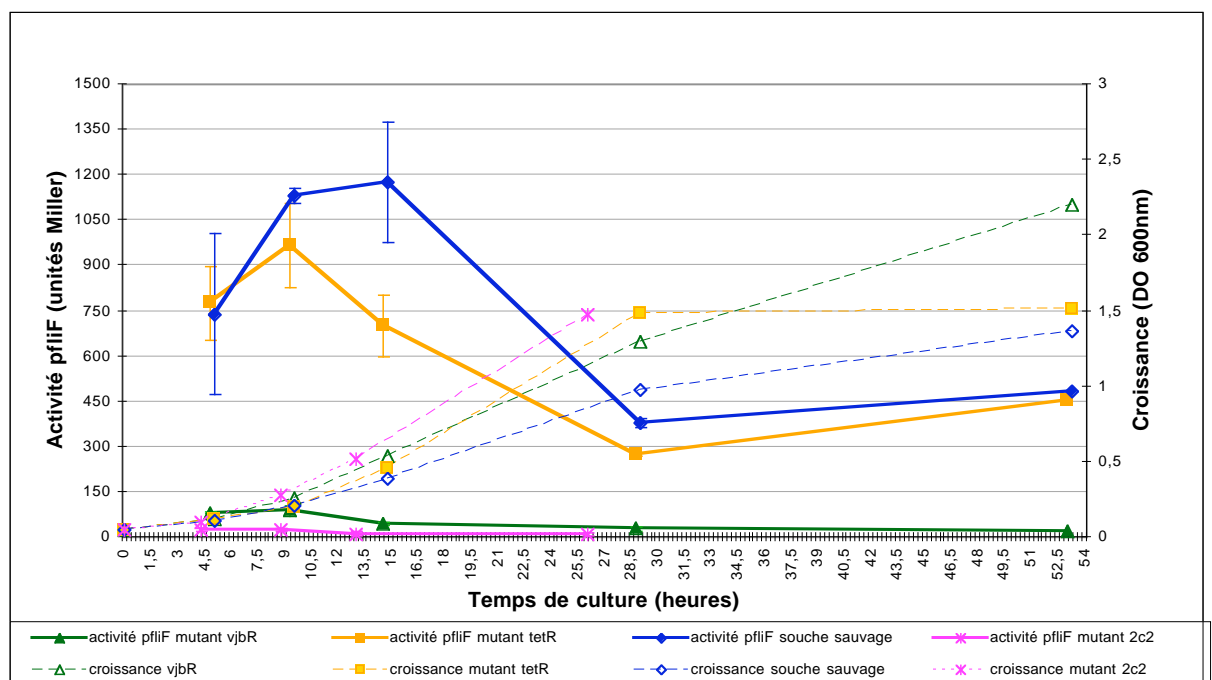


Figure 2 : Dosage b-Gal de l'activité du promoteur de *fliF* (*pflif*) en unités Miller et croissance bactérienne en fonction du temps pour la souche sauvage *B. melitensis* 16M, et les mutants *tetR*, *vjbR* et *2c2*.

Nous observons, pour la souche sauvage de *B. melitensis* 16M, que l'activité de la b-Gal est induite dès 4 heures avec un plateau entre 8h et 15h de culture, ce qui correspond environ au début de la phase exponentielle. Il s'ensuit une diminution drastique de l'activité.

Concernant le mutant *2c2*, on observe par contre une activité b-Gal proche de zéro tout au long de la courbe de croissance.

Pour le mutant *vjbR* on observe une activité b-Gal très réduite par rapport à la souche sauvage. L'activité b-Gal chez ce mutant est très faible, mais est néanmoins plus élevée que chez le mutant *2c2*.

Chez le mutant *tetR*, l'activité b-Gal est initialement comparable à celle de la souche sauvage, puis elle semble diminuer plus rapidement que celle de la souche sauvage, pour s'en rapprocher ensuite de nouveau en phase stationnaire.

1.2. Étude de l'expression de FlgE et de FliC par les mutants *2c2*, *tetR* et *vjbR* comparativement à la souche sauvage

Pour compléter les données d'activité de *pflfF* chez les mutants *2c2*, *vjbR* et *tetR*, une étude de l'expression des monomères du « hook » (FlgE) et du filament du flagelle (FliC) a été réalisée chez ces mutants le long d'une courbe de croissance.

1.2.1. Procédure

Lors de la culture des mutants *2c2*, *tetR* et *vjbR* ainsi que de la souche sauvage réalisée pour les dosages b-Gal (point 1.1.2.) des échantillons ont été prélevés afin d'y détecter la présence de FlgE par western blotting. Des cultures indépendantes ont été réalisées dans des conditions similaires pour détecter FliC.

Des extraits totaux des différentes souches de *Brucella* correspondant aux prélèvements successifs ont été séparés par SDS-PAGE suivi d'un transfert et d'une révélation avec des polysérums de lapin spécifiques de FlgE ou de FliC⁵². Un lysat d'une quantité équivalente de bactéries (évaluée par DO_{600nm}) a été déposé dans chaque puits. Pour cet immunoblotting, nous avons utilisé comme contrôle négatif des souches mutées dans les gènes *flgE* ou *fliC* et cultivées pendant environ 5h dans les mêmes conditions que les souches d'intérêt. Comme contrôles positifs nous avons utilisé du « hook » ou de la flagelline recombinants purifiés⁵².

1.2.2. Résultats et discussion

1.2.2.1. Expression de la protéine FlgE

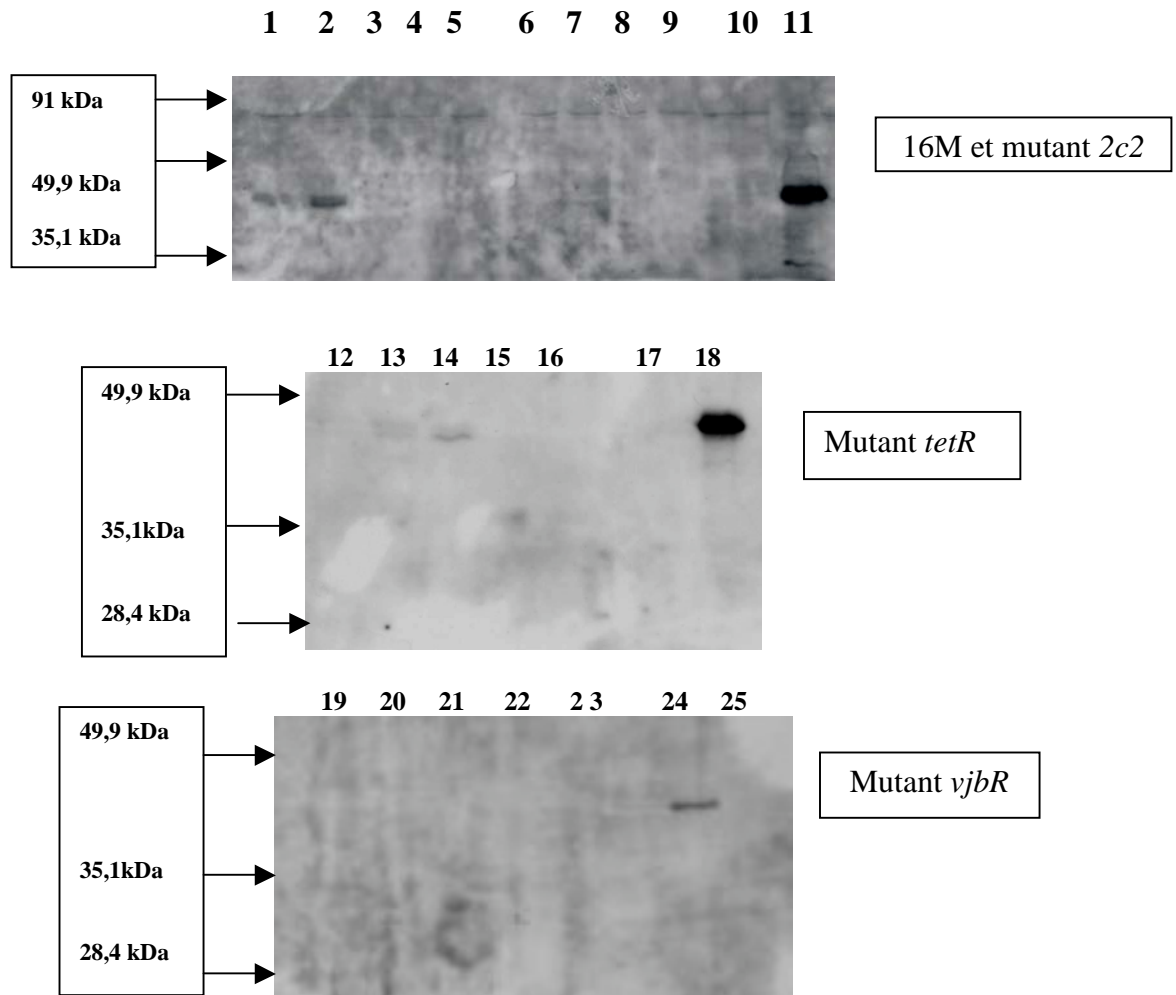


Figure 3: Expression des protéines du « hook » chez la souche sauvage *B. melitensis* 16M (de 1 à 5) et les mutants *2c2* (6 à 9), *tetR* (12 à 16) et *vjbR* (19 à 23). 10 ml d'échantillons d'une $DO_{600} = 3$ chargé par puits. (11,18 et 24) FlgE recombinante purifiée. (25,10 et 17 : mutant FlgE).

1, 6, 12 et 19) **4h**
 2, 7, 13 et 20) **8h**
 3, 8, 14 et 21) **13h**
 4, 9, 15 et 22) **26h**
 16, 5 et 23) **50h**
 10, 17 et 25) **mutant flgE**
 11,18 et 24) « hook » **purifié**

La taille attendue pour le monomère du « hook » est de 40 kDa (Figure 3). Remarquons que la protéine FlgE recombinante purifiée qui sert de contrôle positif possède une taille d'environ 40 kDa + 2kDa due à la présence d'un « tag » contenant six résidus histidine nécessaires à la purification de la protéine par chromatographie d'affinité⁵².

Le mutant *flgE* qui nous sert de contrôle négatif, ne présente aucune bande à la taille correspondant au « hook » de *B. melitensis* 16M (puits 10, 17 et 25).

Pour la souche sauvage de *B. melitensis* 16M nous observons 1 bande à environ 40 kDa après 4h et 8h de culture, correspondant au début de la phase exponentielle de croissance. Par contre, aucune bande n'est visible dans les extraits plus tardifs. Ce résultat est en accord avec les résultats obtenus par D. Fretin. Par ailleurs, on constate une corrélation entre l'expression de FlgE et l'activité du *pfliF*, sauf pour le point 13h où l'activité du *pfliF* persiste alors que la protéine FlgE n'est plus détectable. Ceci pourrait être expliqué par deux hypothèses :

- une grande stabilité de la b-galactosidase ou de son ARN messenger, conduisant à la persistance de l'activité b-Gal après extinction de l'activité de *pfliF*.
- un maintien de l'activité de *pfliF* après le début de la phase exponentielle de croissance impliquant une régulation encore inconnue qui empêcherait la traduction de l'ARN messenger de *fliF* mais non celui de la b-Gal dans le cas du système *pfliF-lacZ*.

Dans les extraits du mutant *2c2*, aucune bande n'apparaît quelque soit la phase de croissance confirmant les résultats obtenus avec le *pfliF*.

Dans les extraits du mutant *vjbR* aucune bande n'est observable à la taille correspondant à FlgE quelque soit le moment des prélèvements indiquant que la très faible activité du *pfliF* détectée dans ce mutant n'est pas suffisante pour mettre FlgE en évidence par immunoblotting.

Concernant le mutant *tetR*, on observe une bande pour les 3 premiers temps de culture (le signal très faible des 2 premières pistes est mal rendu sur le document). Il semble donc que l'activité du *pfliF* dans ce mutant, bien que légèrement réduite par rapport à la souche sauvage, soit suffisante pour permettre une expression de FlgE. L'expression de FlgE serait prolongée dans ce mutant, mais cette observation devra être confirmée.

Etant donné la faible intensité des bandes détectées, l'expérience a été répétée et confirme les résultats obtenus (Figure 4 et point suivant).

1.2.2.2. Expression de la protéine FliC

Les résultats précédents montrent une expression du monomère du « hook » et une activité du *pfliF* en phase de latence et en début de phase exponentielle, endéans les 10 premières heures de culture.

L'expression de la flagelline (FliC) a également été testée chez la souche sauvage et chez les trois mutants.

La souche sauvage *B. melitensis* 16M et les trois mutants *2c2*, *vjbR* et *tetR* ont été cultivés en milieu riche 2YT (DO_{600nm} initiale de 0,05) et des prélèvements d'échantillons ont été effectués après 4h et 8h de culture.

Afin d'optimiser la détection de FliC, la concentration des échantillons bactériens a été doublée par rapport à celle utilisée pour la détection de FlgE (point 1.2.2.1.).

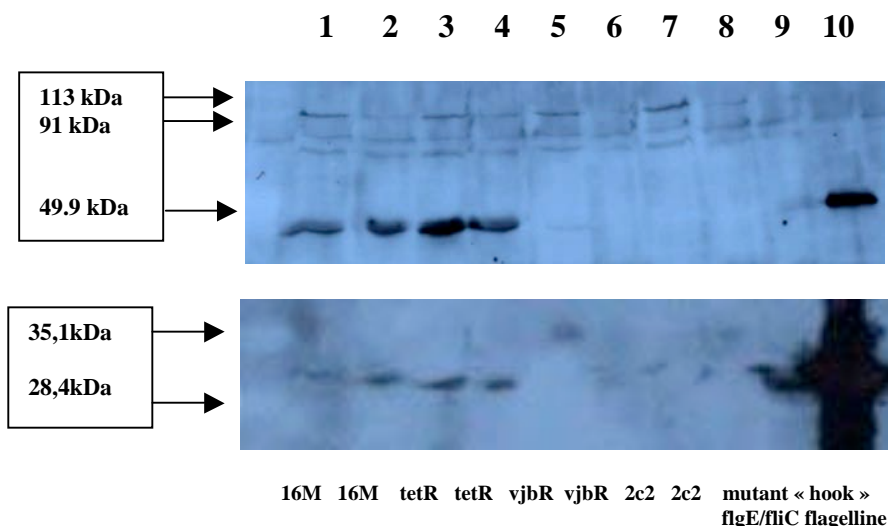


Figure 4: Expression de FlgE (en haut) et de FliC (en bas) chez la souche sauvage *B. melitensis* 16M (1,2), les mutants *tetR* (3, 4), *vjbR* (5,6) et *2c2* (7, 8) après 4h (1, 3, 5,7) et 8h (2, 4, 6,8) de culture en 2YT. Mutant *flgE* ou *fliC* (9). 25ml d'échantillons chargé par puits d'une $DO_{600} = 6$. Protéines FlgE ou FliC recombinante purifiée (10).

La taille attendue pour FliC est de 29 kDa (Figure 4). La protéine FliC recombinante est détectée à la taille attendue de 31 kDa (dont 2kDa de tag), et un extrait total d'une souche mutée dans le gène *fliC* ne montre pas la protéine FliC.

Les résultats montrent une expression de la flagelline dans la souche sauvage et le mutant *tetR* après 4h et 8h de culture. Par contre, aucune bande n'est détectée chez les mutants *vjbR* et *2c2*.

L'expression du « hook » a également été vérifiée et confirme une expression parallèle de FliC et de FlgE en début de croissance chez la souche sauvage et le mutant *tetR*. De plus, dans le mutant *2c2* et *vjbR*, ni FliC ni FlgE ne sont détectées.

1.2.3. Conclusion

L'activité de *pfliF* et l'expression de FlgE et de FliC sont parallèles : induction en début de phase de croissance puis diminution de l'expression et même disparition des protéines FlgE et FliC. Les différences observées entre l'activité b-Gal traduisant l'activité du *pfliF* et l'expression de FlgE après 13 heures de culture nécessite de répéter le western blotting dans des conditions qui amélioreraient la détection : diminuer le bruit de fond et augmenter la

quantité d'extraits bactériens chargés sur le gel. Ces conditions ont été utilisées dans le second immunoblotting mais seuls les temps 4h et 8h ont été testés.

Nos résultats démontrent que le régulateur de réponse *2c2* et que le régulateur transcriptionnel *VjbR* sont deux activateurs directs ou indirects de *pfliF*, chacun indispensable à son induction dans nos conditions de culture.

Les résultats parallèles obtenus pour l'expression de *FlgE* et *FliC* sont en accord avec une expression hiérarchisée des gènes flagellaires : en l'absence d'expression de *fliF*, on s'attend à une absence d'expression de protéines de la partie distale du flagelle comme *FlgE* et *FliC*; c'est ce qui est observé dans les mutants *2c2* et *vjbR*.

La mutation de *tetR* semble avoir un effet (qui nécessite confirmation) sur l'activité de *pfliF* mais cet effet n'est pas observable au niveau de l'expression de protéines *FlgE* et *FliC*. Le rôle éventuel de ce régulateur dans l'opéron flagellaire reste à investiguer.

2. Constructions plasmidiques pMR10-p2c2-2c2, pMR10-pfliF-fliF et pET15B-2c2

2.1. Introduction

Les résultats détaillés dans le chapitre précédent montrent un effet important de la mutation de *vjbR* et de *2c2* sur l'expression des gènes flagellaires testés (*fliF*, *flgE* et *fliC*).

Afin de s'assurer que l'effet observé est bien strictement lié aux gènes mutés et ne provient pas d'un effet polaire exercé par la mutation sur les gènes voisins, une expérience de complémentation s'avère nécessaire. Il s'agit d'introduire dans une souche mutée pour un gène donné une copie sauvage de ce gène, afin d'observer si une restauration du phénotype sauvage a lieu.

Concernant le mutant *vjbR*, le phénotype mutant a été complété par une copie sauvage du gène *vjbR* apportée par un plasmide montrant que le phénotype mutant est dû à la mutation de *vjbR* et non à un effet polaire⁵⁰

Par ailleurs, nous disposons au laboratoire d'un mutant transpositionnel de *B. melitensis* 16M dans le gène *fliF*, présentant un phénotype d'atténuation au cours d'une infection de modèles cellulaires et murins, et n'exprimant ni les monomères du « hook » ni ceux de la flagelline en phase de latence⁵². Afin de pouvoir attribuer ces phénotypes à la mutation seule du gène *fliF*, une expérience de complémentation est nécessaire.

Trois constructions plasmidiques ont été réalisées dans ce travail, deux ayant pour but des tests de complémentation de mutants flagellaires (*2c2* et *fliF*), et la troisième en vue de surexprimer la protéine *2c2* pour la purifier.

2.2. Réalisation des constructions plasmidiques pMR10-pfliF-fliF et pMR10-p2c2-2c2

En vue de compléter les mutants *2c2* et *fliF*, la première étape du travail a consisté à réaliser des constructions plasmidiques portant une copie de chacun des gènes d'intérêt (*2c2* et *fliF*) sous la dépendance de leur promoteur respectif. À cette fin, des couples d'oligonucléotides ont été définis pour servir d'amorces pour une amplification par PCR (à partir d'ADN génomique de *B. melitensis* 16M) des fragments d'ADN correspondant à l'ORF *2c2* et à la séquence non-codante située en amont et potentiellement promotrice (*p2c2-2c2* d'une taille de 1132 nucléotides, 448 bp en amont de l'ORF *2c2*) et à l'ORF *fliF* et à la

séquence non-codante située en amont et potentiellement promotrice *p_{fliF}* (*p_{fliF}-fliF* d'une taille de 2051 nucléotides, 307 pb en amont de l'ORF *fliF*). Précisons que *fliF* est séparé de l'ORF précédente *fliC* par 203 pb et que *2c2* est localisé 328 pb en aval de l'orf BMEII0157. L'ORF *2c2* ne semble pas faire partie d'un opéron alors que *fliF* serait, sur la base d'analyse de séquences, la première ORF d'un opéron en comptant 7 (Figure 5).

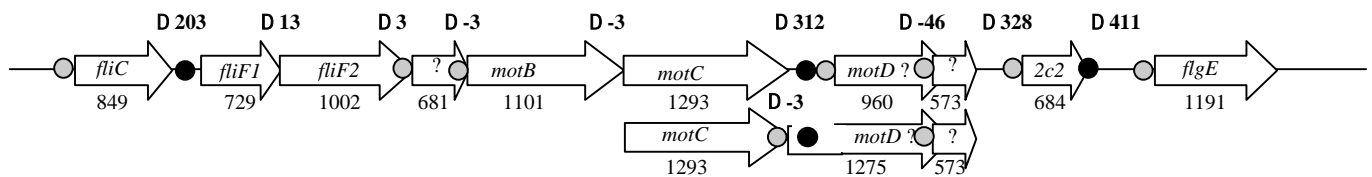


Figure 5 : Représentation d'une partie du locus flagellaire I.

- = motif Shine-Dalgarno
- = terminateur transcriptionnel potentiel
- ? = ORF sans homologue de fonction connue
- 2c2 = séquence codante du régulateur transcriptionnel potentiel 2c2
- chiffres = taille de l'ORF, en nucléotides
- D = distance séparant 2 ORF consécutives, en nucléotides

Des séquences de type attB1 et attB2 ont été ajoutées aux oligonucléotides de façon à réaliser ces constructions avec le système Gateway. Le système Gateway est basé sur les réactions de recombinaison permettant l'intégration et l'excision du phage lambda dans le génome d' *E. coli*. Cette méthode permet la recombinaison directionnelle d'un produit PCR (portant le gène d'intérêt et 2 sites de recombinaison *attB* ajoutés grâce aux amorces de PCR) et d'un vecteur donneur (portants 2 sites *attP*) grâce à une réaction de recombinaison dite de « BP ». Le produit de cette première recombinaison, appelé vecteur d'entrée, sert de matrice à une seconde recombinaison (dite de « LR ») avec un vecteur de destination (portant 2 sites de recombinaison *attR*) pour obtenir un vecteur d'expression (Figure 6).

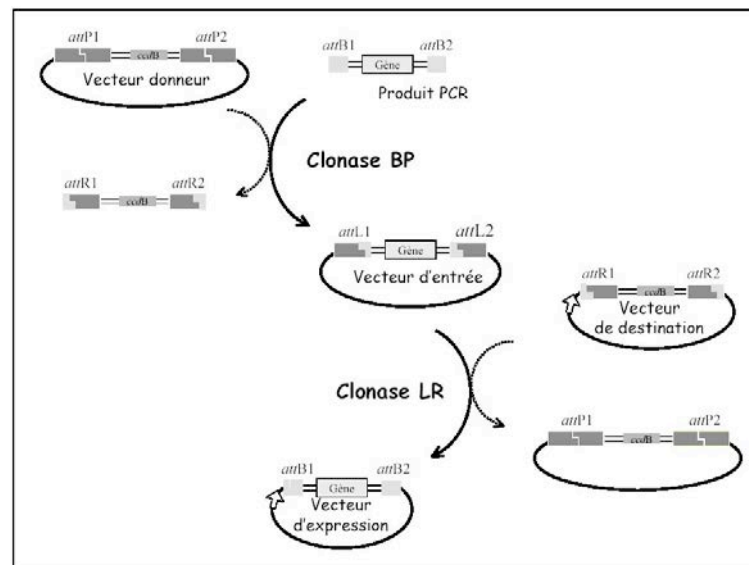


Figure 6 : Représentation schématique du système Gateway avec les réactions « BP » et « LR ».

À chacune des étapes de recombinaison, un fragment contenant le gène *ccdB*, toxique pour la souche *E. coli* DH10B, est éliminé pour être remplacé par le fragment d'intérêt, impliquant que seuls les plasmides recombinants sont sélectionnés suite à la transformation de *E. coli* DH10B par le produit de recombinaison.

Après PCR, les amplicons *p2c2-2c2* et *pfliF-fliF* ont été déposés sur gel d'agarose pour une électrophorèse puis extraits et purifiés.

L'étape suivante est le clonage des amplicons dans le vecteur donneur pDONR201. A cette fin, le vecteur vide a été préparé à partir de la souche d'*E. coli* DB3.1 résistante à *ccdB*, puis, afin d'optimiser le rendement de la réaction « BP », ce vecteur a été restreint par *Nco* I. Une électrophorèse en gel d'agarose montre une seule bande correspondant au vecteur linearisé (entre 4000bp et 5000bp) (Figure 7).

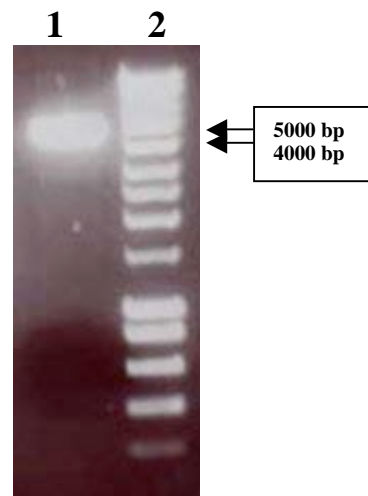


Figure 7 : Électrophorèse en gel d'agarose 1% du pDONR201 restreint avec l'enzyme NcoI.

Piste 1 : plasmide pDONR201 d'une taille de 4470 bp

Piste 2 : Marqueur de taille « Hypper ladder »

Les amplicons *p2c2-2c2* et *pfliF-fliF* ont été transférés par recombinaison dans le pDONR201 linéarisé à l'aide de l'enzyme « BP clonase ». Le produit de cette réaction a ensuite été utilisé pour transformer une souche de *E. coli* DH10B puis étalé en présence de kanamycine afin de sélectionner les clones contenant le plasmide d'intérêt. Une minipréparation d'ADN plasmidique a été réalisée sur les cultures des clones candidats pour chacune des constructions. Une double restriction Hpa I et Pvu II a été appliquée et vérifiée par une électrophorèse en gel d'agarose. Cette double restriction permet de libérer l'insert contenu dans le plasmide et donne les profils suivants: 1 bande aux alentours de 2000 bp pour la matrice du plasmide pDONR et une bande vers 1250 bp pour *p2c2-2c2*. La double restriction des candidats *pfliF-fliF* doit générer 3 bandes : 2000 bp pour la matrice et 2 bandes entre 1000 bp et 1500 bp. *pfliF-fliF* possède en effet un site PvuII (Figure 8).

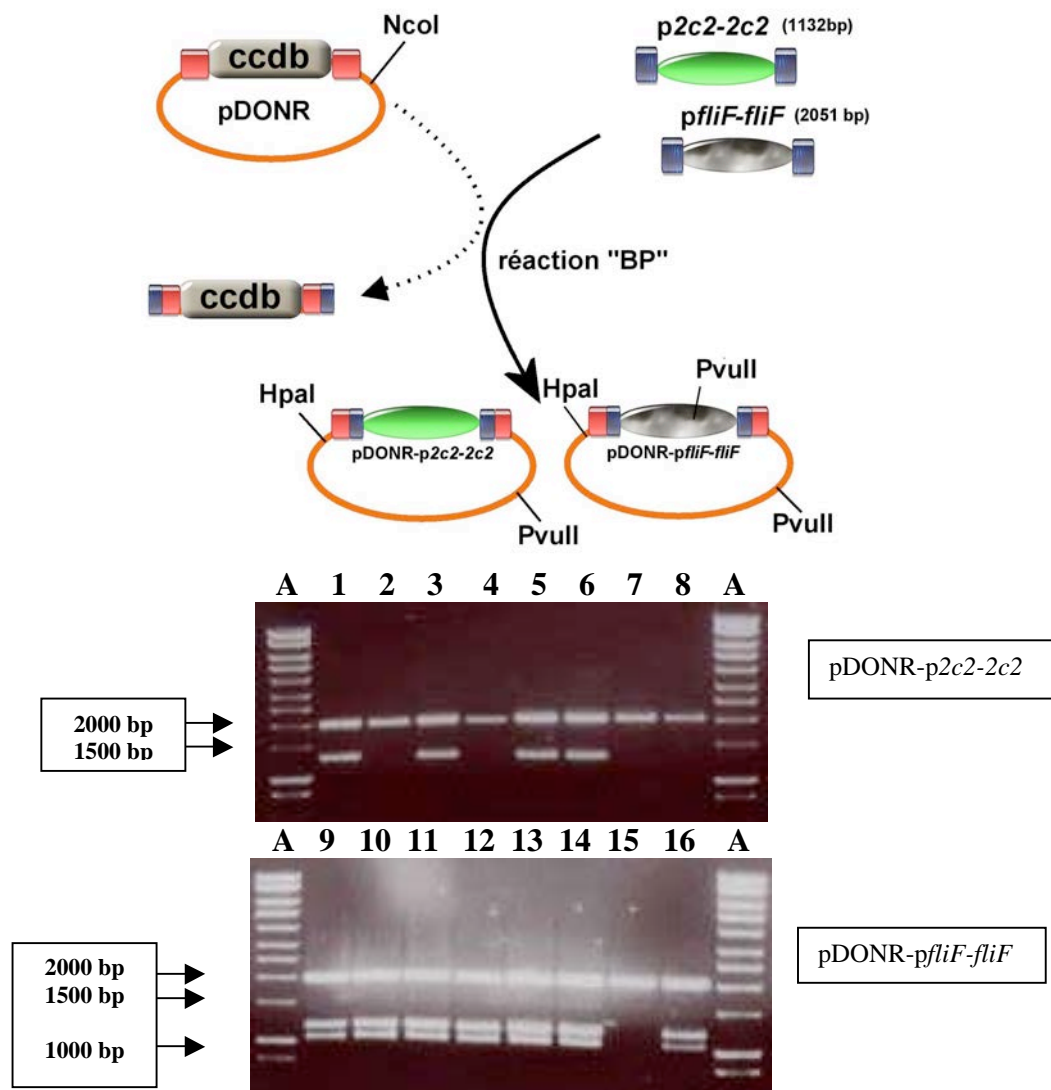


Figure 8 : Schéma des constructions et électrophorèse en gel d'agarose 1% des *pDONR-p2c2-2c2* (au dessus) et *pDONR-pfliF-fliF* (en-dessous).

Piste A : Marqueur de taille « Hypper ladder »

Piste 1, 3, 5 et 6: plasmides *pDONR-p2c2-2c2*

Piste 9 à 14 et 16 : plasmides *pDONR-pfliF-fliF*

Autres pistes : Plasmide vide

À ce stade, les vecteurs d'entrée *pDONR p2c2-2c2* et *pDONR pfliF-fliF* ont été séquencés pour s'assurer qu'aucune mutation n'a été introduite. Ces vecteurs d'entrée contenant un candidat de séquence correcte ont alors été utilisés lors de la réaction « LR » Gateway pour transférer l'insert *p2c2-2c2* (clone 3) ou *pfliF-fliF* (clone 13) dans le vecteur de destination *pMR10 Gateway* (aménagé au laboratoire par R. Hallez) à l'aide de l'enzyme clonase « LR ».

Le plasmide pMR10 est un plasmide à faible nombre de copies dérivé du plasmide pGL10 et qui possède un site multiple de clonage dans le gène *lacZa*. Ce plasmide possède un gène de résistance au chloramphénicol, il est mobilisable par conjugaison et est réplcatif chez *Brucella*, *C. crescentus* et *E. coli*. Les produits de la réaction « LR » ont été utilisés pour transformer une souche de *E. coli* DH10B puis étalés en présence de chloramphénicol afin de sélectionner les clones contenant les constructions plasmidiques.

Les plasmides ont été récupérés par minipréparation et restreints par EcoRV. L'enzyme EcoRV coupe à proximité des sites *attP1* et *attP2* dans les constructions pMR10-*pflfF-fliF* et pMR10-*p2c2-2c2* donnant pour chacune des constructions 2 fragments : l'insert d'une taille de ± 1131 pb pour *p2c2-2c2* et de 2051pb pour *pflfF-fliF*, et le vecteur pMR10 d'une taille d'environ 9500bp (Figure 9).

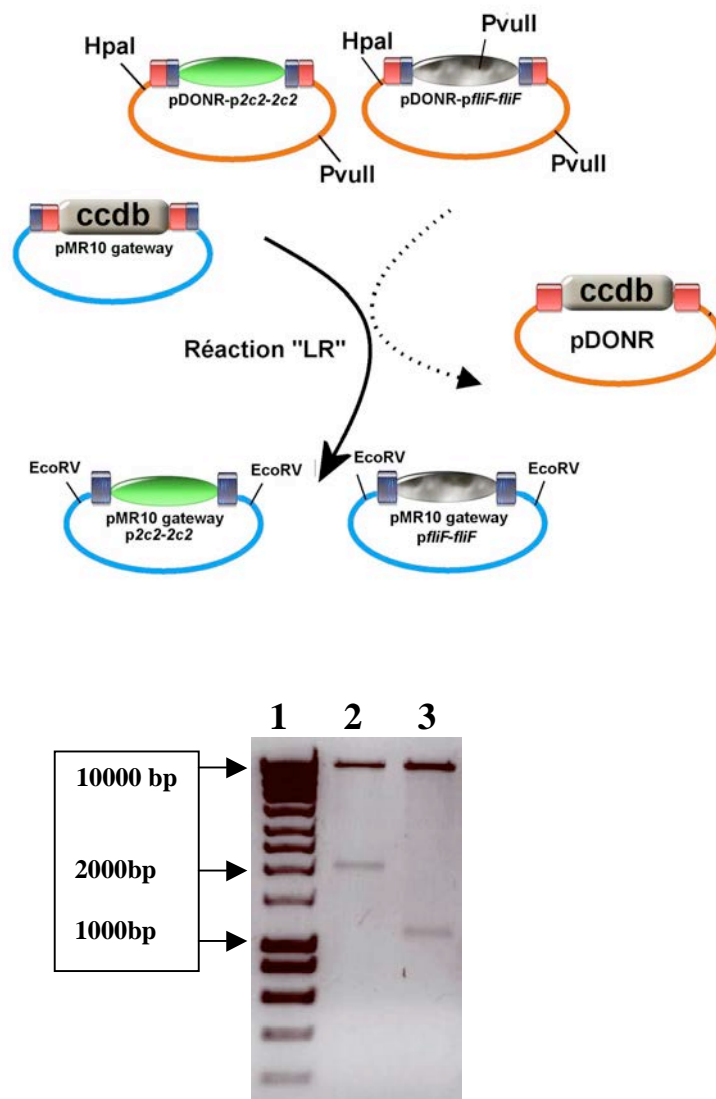


Figure 9 : Schéma des constructions et électrophorèse en gel d'agarose 1% du pMR10-*p2c2-2c2* et pMR10-*pflfF-fliF*

Piste 1 : Marqueur de taille « Hypper ladder »

Piste 2 : pMR10 d'une taille ± 9000 bp et l'insert *pflfF-fliF* à ± 2000 bp

Piste 3 : pMR10 d'une taille ± 9000 bp et l'insert *p2c2-2c2* à ± 1100 bp

2.3. Transfert des constructions pMR10-p*fliF*-*fliF* et pMR10-p*2c2*-*2c2* dans les mutants à compléter

Les constructions pMR10-p*fliF*-*fliF* et pMR10-p*2c2*-*2c2* ont été introduites dans une souche donneuse de *E. coli* pour être transférées ensuite par conjugaison dans les souches mutantes *fliF* et *2c2* de *B. melitensis* 16M respectivement. La souche donneuse de *E. coli* S17 a été utilisée car elle encode la machinerie nécessaire au transfert conjugal d'ADN. Après sélection sur chloramphénicol des colonies d' *E. coli* S17 contenant les constructions, des conjugaisons ont été réalisées, et les *Brucella* transconjugantes sélectionnées en présence d'acide nalidixique et de chloramphénicol.

Un « western-blot » a été réalisé sur des extraits totaux d'un clone du mutant *2c2* contenant le pMR10-p*2c2*-*2c2* avec le polysérum anti-FlgE et montre une restauration de l'expression du monomère du « hook » aux temps précoces de culture (4 et 8 heures) puis une disparition de l'expression, ce profil d'expression est tout à fait semblable à celui de la souche sauvage (Figure 10). Le pMR10-p*2C2*-*2C2* a donc complété le mutant *2c2* indiquant que l'absence d'expression de FlgE chez le mutant *2c2* est due à la mutation de *2c2* et pas à un effet polaire sur des gènes voisins.

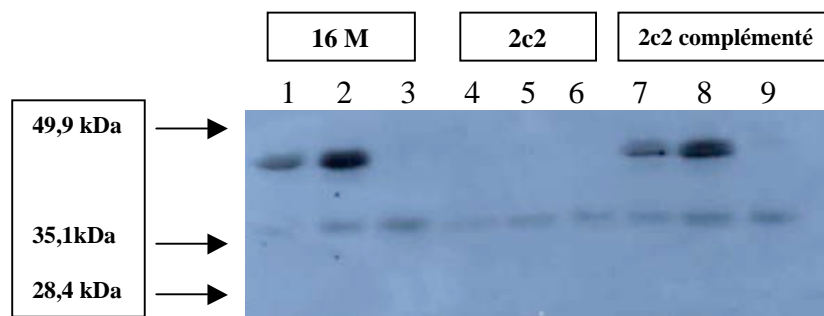


Figure 10: Immunoblotting avec anti-FlgE sur la souche sauvage, le mutant *2c2* et le mutant *2c2* complémenté avec la construction pMR10-p*2c2*-*2c2* (7-8-9). Après 4h (1-4-7), 8h (2-5-8) et 11h15 de culture (3-6-9). 20ml d'échantillons chargés par puits d'une DO₆₀₀ = 6 .

La restauration de l'expression de la flagelline par cette complémentation sera vérifiée ultérieurement.

Des « westerns-blotting » devront également être réalisés avec le mutant *fliF* contenant le pMR10-p*fliF*-*fliF* pour vérifier la restauration de l'expression des monomères du « hook » et de la flagelline. En outre, des infections de modèles cellulaires seront mises en oeuvre avec les clones du mutant *fliF* contenant le pMR10-p*fliF*-*fliF* pour tester la complémentation du mutant.

2.4. Réalisation de la construction plasmidique pET15B-2c2

Nous avons montré, dans le chapitre précédent, une implication du gène *2c2* dans la régulation flagellaire chez *B.melitensis* 16M, en travaillant avec une souche mutée dans ce gène. Afin d'étudier plus précisément le rôle et l'expression de *2c2* chez *Brucella*, des manipulations impliquant une forme purifiée de la protéine *2c2* sont à envisager.

Citons par exemple, la production d'anticorps reconnaissant la protéine *2c2* pour étudier l'expression de cette protéines dans différentes conditions et dans différentes souches de *Brucella*, ou encore la réalisation de « footprint » pour identifier la région promotrice cible du régulateur *2c2* dans le génome de *Brucella*, et plus particulièrement en amont de *fliF* si l'effet de *2c2* est direct.

Dans ce travail, nous avons réalisé une construction plasmidique permettant la surexpression de *2c2* chez *E. coli* : le pET15B-2c2.

Le plasmide pET15B possède un promoteur fort de type pLac, inductible à l'IPTG, et classiquement utilisé pour la surexpression de protéines chez *E. coli*. Ce plasmide possède un gène de résistance à l'ampicilline. Au laboratoire, R. Hallez (thèse en cours) a aménagé ce plasmide pour le rendre compatible avec le système Gateway, sous forme de vecteur de destination pET15B-Gateway.

En vue de surexprimer la protéine *2c2*, nous avons cloné l'ORF *2c2* dans ce pET15B Gateway. Un vecteur d'entrée pDONR contenant l'ORF *2c2* (vérifié par séquençage) a été mis à notre disposition au laboratoire (S. Léonard, thèse en cours) et utilisé pour réaliser une réaction « LR » avec le pET15B-Gateway.

Le produit de la réaction « LR » a été utilisé pour transformer une souche d'*E. coli* DH10B et les bactéries ont été cultivées en présence d'ampicilline afin de sélectionner les clones contenant la construction. Ensuite, une minipréparation a été réalisée sur plusieurs clones pour récupérer la construction. Les plasmides ont été restreints par l'enzyme *EcoRV* et le produit de la restriction soumis à une électrophorèse en gel d'agarose. Les fragments de taille attendue ont été observés vers 4000 bp et 2000 bp (Figures 11a et 11b).

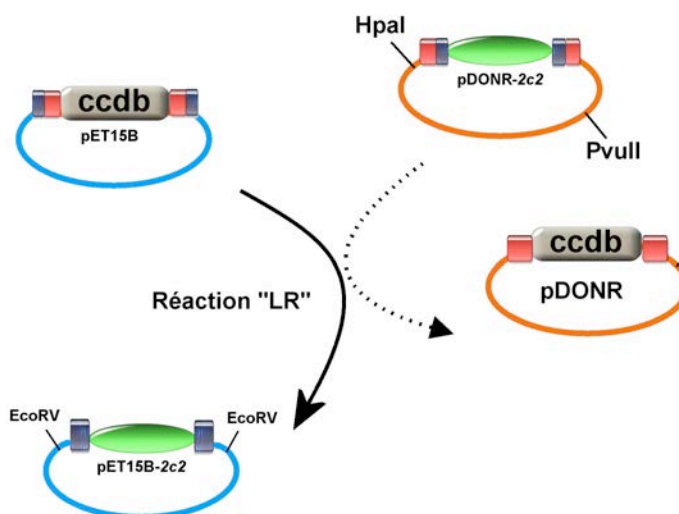


Figure 11a : schéma illustratif de la réaction LR entre le pDONR-2c2 et le pET15B.

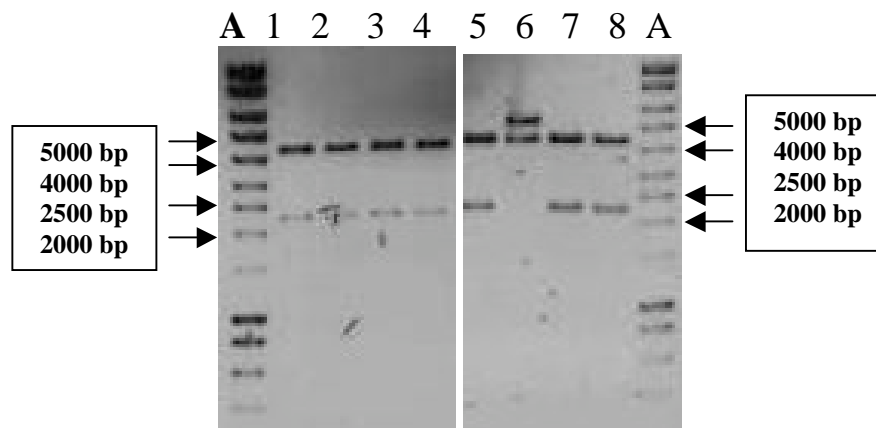


Figure 11b : Electrophorèse en gel d'agarose 1% de pET15B-2c2
 Piste A : Marqueur de taille « Hypper ladder »
 Piste de 1 à 5 et 7, 8 : plasmide pET15B-*pfliF-fliF* avec un fragment à 4229 bp et un à 2221 bp

Cette construction pET15B sera transférée dans une souche de *E. coli* BL21(DE3) permettant de surexprimer la protéine 2c2 et celle-ci sera purifiée en IMAC.

3. Recherche d'un flagelle chez *B. melitensis* 16M par visualisation en « negative staining »

Brucella a toujours été décrite comme une bactérie non flagellée. Cependant, les données fournies par l'étude du génome de *B. melitensis* et *B. suis* montrent que ces bactéries possèdent tout le matériel génétique nécessaire à la production d'un flagelle bactérien. Par ailleurs, une expression des protéines monomériques du « hook » et du filament, ainsi qu'une activité du promoteur du gène *fliF* ont été mises en évidence chez *B. melitensis* 16M. Cependant ces expressions n'ont lieu que pendant une période relativement courte de la croissance de *Brucella*, c'est-à-dire, en fin de phase de latence et au début de la phase exponentielle, et donc, si *Brucella* construit un flagelle, il ne sera visible qu'à ce moment. Nous avons donc décidé de visualiser en microscopie électronique à transmission après coloration négative (ou « negative staining ») des échantillons de *B. melitensis* 16M prélevés au cours la phase de latence/début de phase exponentielle pour tenter de détecter la présence de structures flagellaires.

3.1. Essais préliminaires de visualisation de flagelles bactériens par la technique de « negative staining » sur *Caulobacter crescentus*

Avant de travailler sur *B. melitensis* 16M, nous avons testé la technique de coloration négative sur la bactérie *C. crescentus*, une bactérie flagellée disponible au laboratoire et

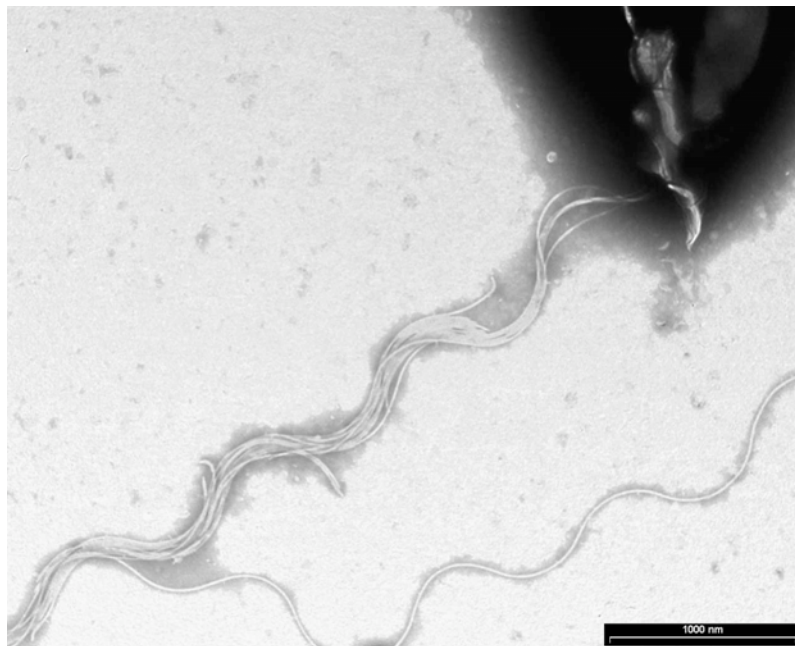
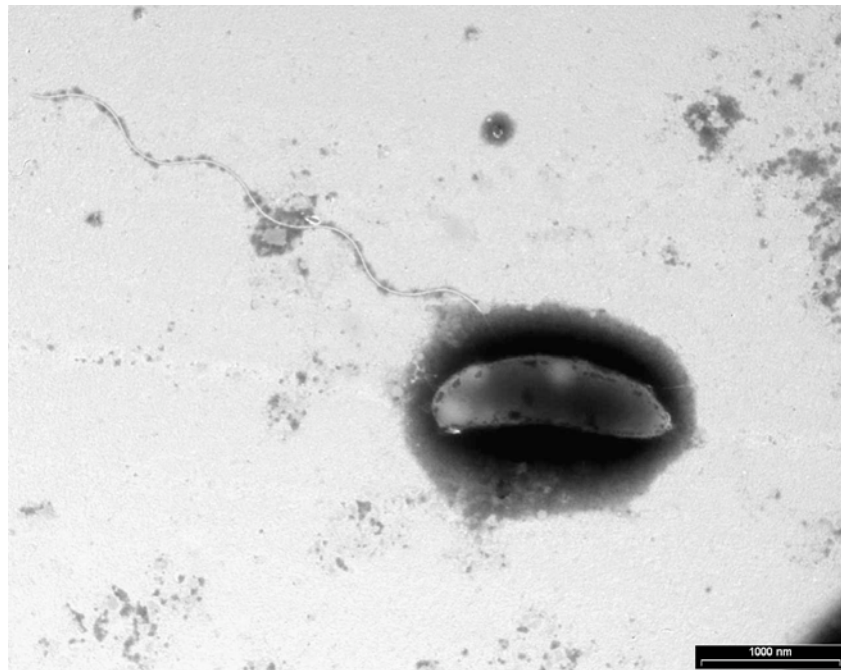


Figure 12: Coloration négative à l'acide phosphotungstique de *Caulobacter crescentus* en microscopie électronique. Le trait blanc représente une longueur de 1 μ m.
Photo du haut : une bactérie *C. crescentus* flagellée.
Photo du bas : Amas de flagelles.

facilement cultivable. De plus, une culture bactérienne de *C. crescentus* présente des bactéries flagellées durant toutes les phases de croissance.

Les bactéries ont été cultivées en milieu PYE à 30°C pendant ± 20 h, puis centrifugées et fixées avec du paraformaldéhyde. Des échantillons ont ensuite été déposés sur des grilles de microscopie et colorés à l'acétate d'uranyle ou à l'acide phosphotungstique, puis observés au microscope électronique. Nous avons visualisé les corps bactériens et le flagelle de *C. crescentus* (Figure 12).

Des bactéries et des flagelles sont nettement distinguables sur les photos et en nombre important. De nombreux flagelles détachés apparaissent également aux alentours des bactéries. La structure du flagelle apparaît sinusoïdale et d'épaisseur régulière.

3.2. Visualisation d'un flagelle potentiel chez *Brucella melitensis* 16M en « negative staining »

3.2.1. Préparation des échantillons

Après incubation durant une nuit à 37°C en milieu bactériologique riche (2YT) des préculture de *B. melitensis* 16M ont été utilisées pour lancer les cultures dans 50 ml de 2YT, ajusté à une DO₆₀₀ initiale de 0,05. Les cultures ont été placées à 37 °C sous agitation durant 4h ou 8h , temps auxquels une expression de FlgE et FliC ainsi qu'une activité de *pfl*F ont été observées. Des échantillons ont également été prélevés en phase stationnaire. Après centrifugation, les bactéries ont été fixées au paraformaldéhyde puis déposées sur grille de microscopie et colorées à l'acétate d'uranyle ou à l'acide phosphotungstique. Des échantillons ont été préparés à plusieurs reprises à partir de cultures indépendantes selon la même procédure.

Des résultats obtenus au laboratoire suggèrent que l'utilisation d'un milieu pauvre augmenterait de 4 à 5 fois l'activité du *pfl*F (S. Léonard thèse en cours). Pour cette raison, des bactéries ont également été cultivées en milieu appauvri en nutriments puis récoltées après 8h00 de culture et colorées à l'acétate d'uranyle ou à l'acide phosphotungstique.

3.2.2. Observation des échantillons au microscope électronique à transmission et discussion

Nous avons tout d'abord analysé les échantillons correspondant à la fin de phase de latence de la culture bactérienne (4h). Nous avons observé une quantité relativement élevée de bactéries sur la grille pour la plupart de type coccobacille et non flagellées.

Cependant, un appendice filamenteux aux abords de certaines bactéries a été visualisé avec la coloration à l'acétate d'uranyle (Figures 13 à 15).

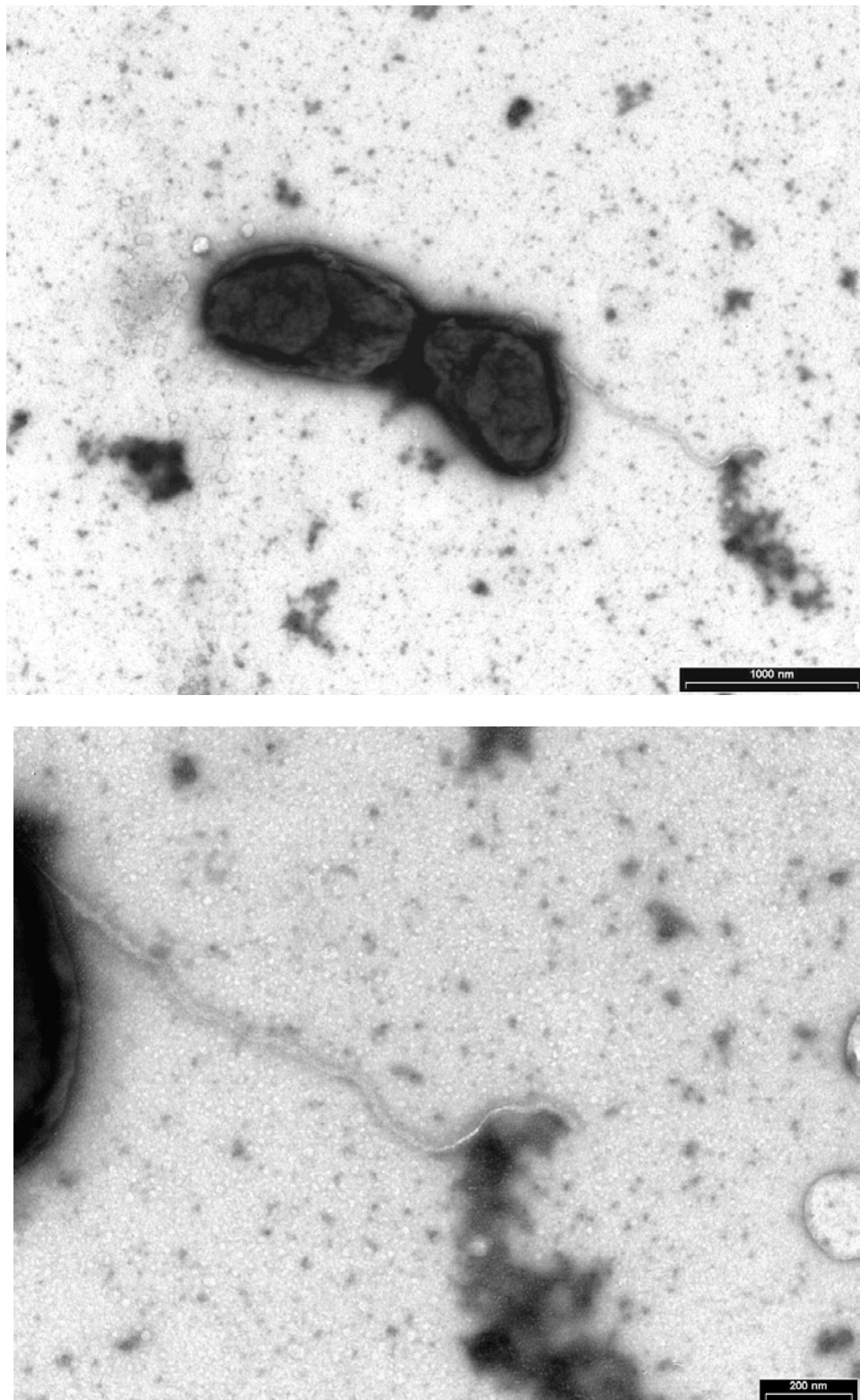


Figure 13: Coloration négative de *Brucella melitensis* 16M en microscopie électronique après 4h de culture en milieu riche. Le trait blanc représente une longueur de 1µm pour l'image du haut et 200nm pour celle du bas.
Photo du haut : Bactérie en division et présence d'une structure filamenteuse.
Photo du bas : Agrandissement de cette structure.

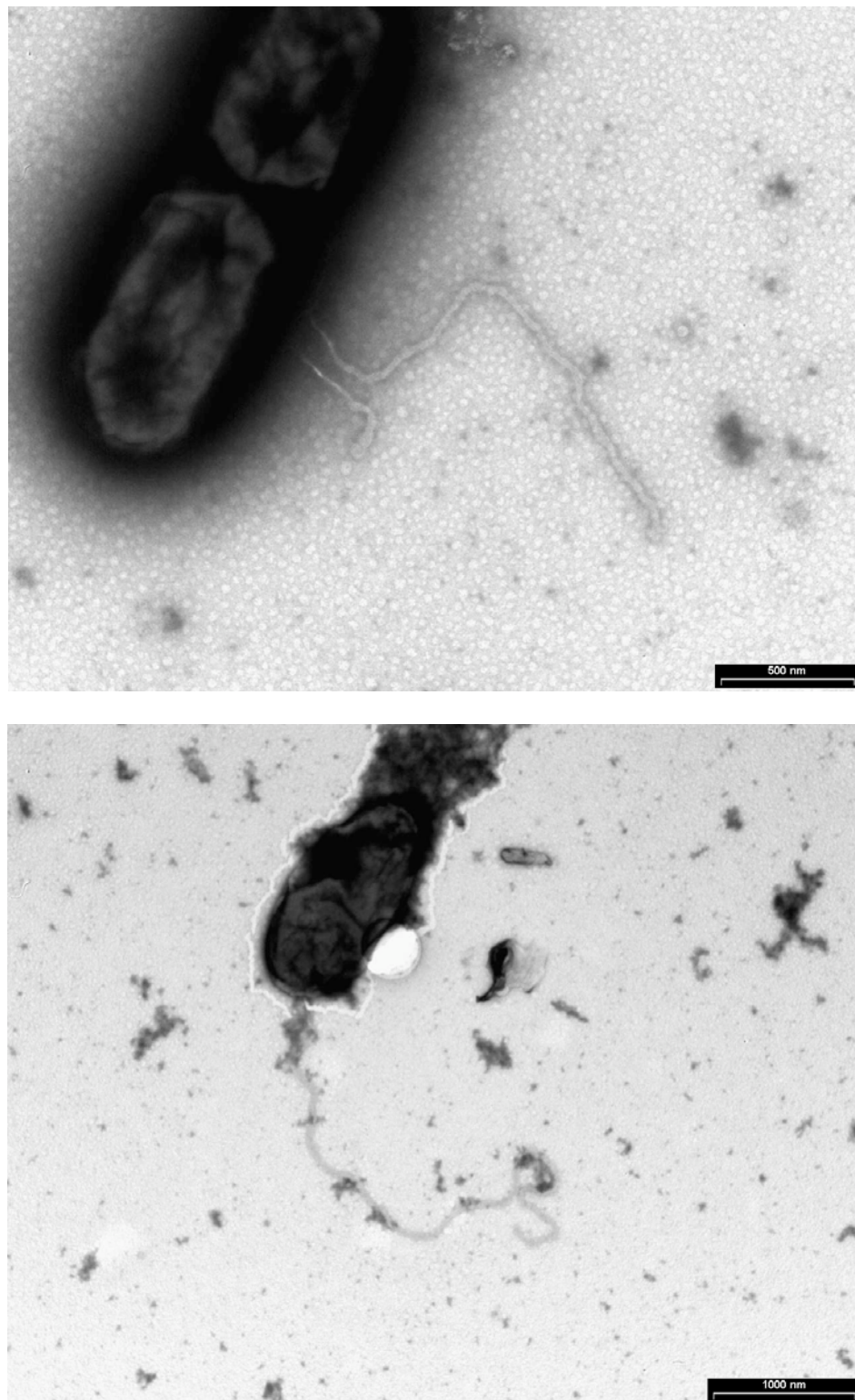


Figure 14: Coloration négative de *Brucella melitensis* 16M en microscopie électronique après 4h de culture en milieu riche.
Observation d'un flagelle potentiel.
Le trait blanc représente une longueur de 500 nm pour l'image du haut et 1µm pour celle du bas.

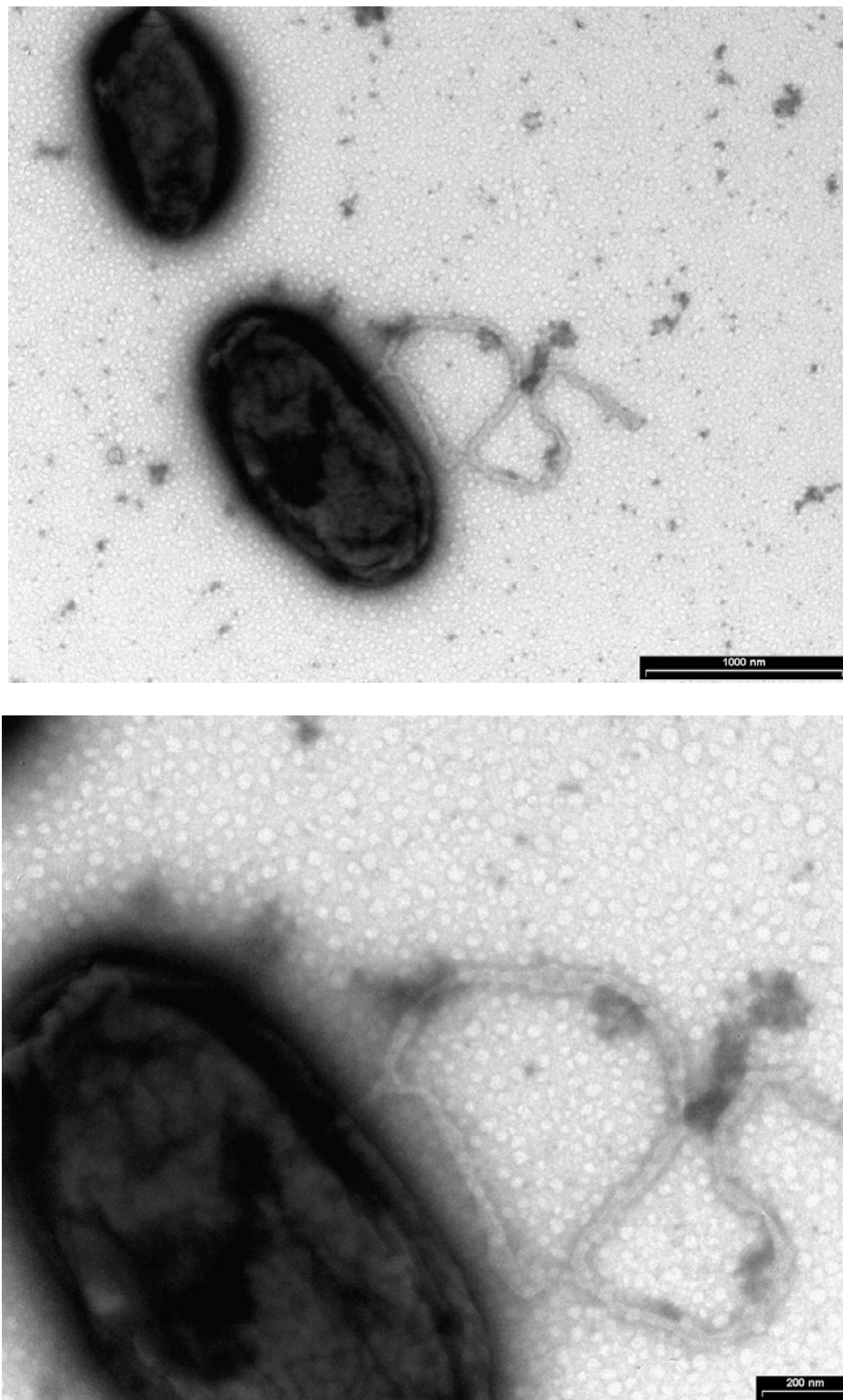


Figure 15: Coloration négative de *Brucella melitensis* 16M en microscopie électronique après 4h de culture en milieu riche. Le trait blanc représente une longueur de 1µm pour l'image du haut et 200nm pour celle du bas.
Photo du haut : Bactérie présentant une structure filamenteuse.
Photo du bas : Agrandissement de cette structure.

Cet appendice possède un contour bien discernable et un diamètre apparent de ± 20 nm. Dans tous les cas, une seule structure a été observée par bactérie, généralement sur une bactérie en fin de division cellulaire. Si l'on compare cette structure au flagelle de *C. crescentus* on observe des différences:

- 1. on remarque une structure moins régulière chez *Brucella* contrastant avec la structure sinusoïdale d'aspect plus rigide observée chez *C. crescentus*.
- 2. le flagelle de *C. crescentus* possède un diamètre stable alors que celui de la structure filamenteuse de *Brucella* semble variable de quelques nm par endroit.
- 3. cette structure semble relativement plus courte que le flagelle de *C. crescentus*, et présente parfois un aspect replié sans doute dû au traitement subi.

Pour les échantillons cultivés en milieu pauvre et récoltés après 7h30 nous avons retrouvé des structures filamenteuses semblables à celles décrites ci-dessus (Figure 16).

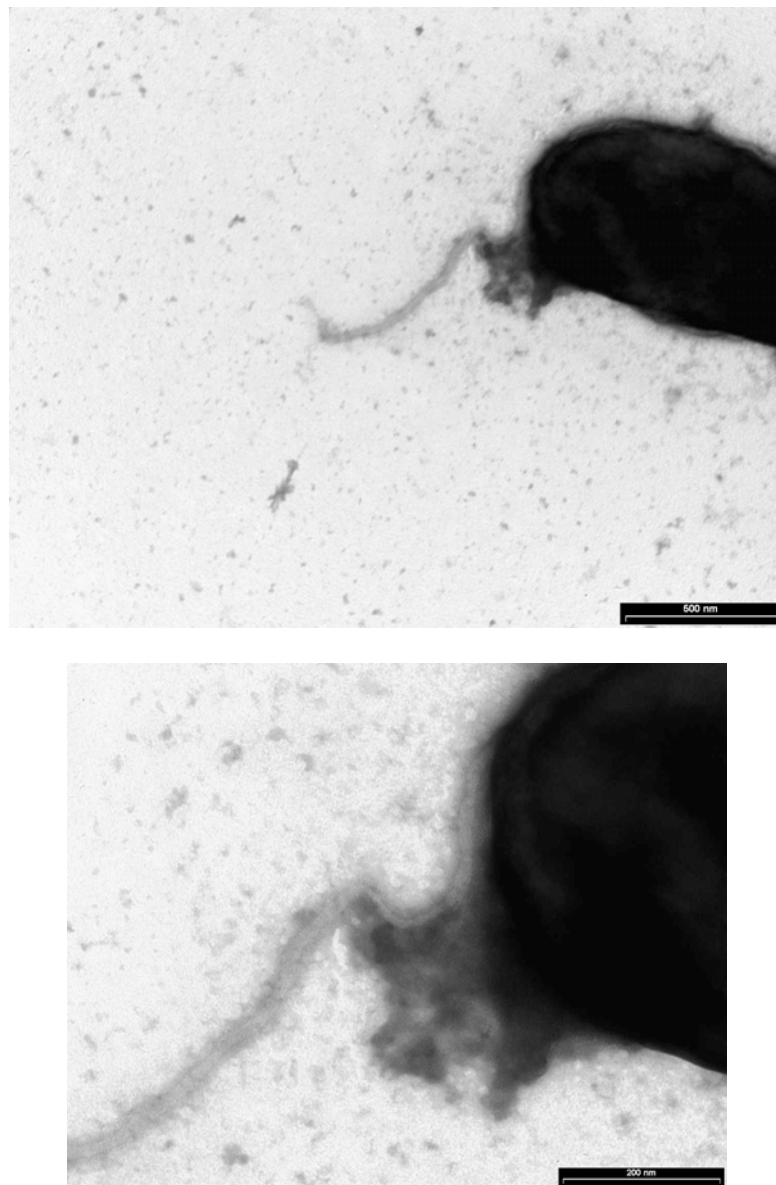


Figure 16: Coloration négative de *Brucella melitensis* 16M en microscopie électronique après 7h30 de culture en milieu pauvre.
Observation d'un flagelle potentiel.
Le trait blanc représente une longueur de 500 nm pour l'image du haut et 200 nm pour l'image du bas.

Par contre, sur les échantillons correspondant à la phase stationnaire de culture, aucune structure filamenteuse n'a été observée.

Toutefois, la rareté des appendices filamenteux observés (environ une bactérie sur 1000) peut sembler surprenante par rapport aux résultats de « western-blot » et des dosages b-Gal pour lesquels un signal d'expression flagellaire est suffisant pour être détecté. Remarquons ici que plusieurs structures isolées, détachées des bactéries semblent avoir un aspect filamenteux mais l'intensité du bruit de fond ne nous permet pas de distinguer clairement ces structures. Il est possible que le flagelle potentiel de *Brucella* soit relativement fragile et/ou rapidement dégradé, ce qui expliquerait les difficultés d'observation de cette structure sous sa forme native (et fixée à la bactérie).

Conclusions et perspectives

Depuis sa découverte à la fin du XIXe siècle, *Brucella* a toujours été décrite comme une bactérie non mobile. En 1998, cependant, trois gènes homologues à des gènes flagellaires bactériens sont mis en évidence dans son génome⁵¹.

Ensuite, la découverte d'une quinzaine d'autres gènes flagellaires et le séquençage du génome de *B. melitensis* et de *B. suis*, en 2002, mettent à jour un total de 31 gènes flagellaires organisés en trois loci sur le petit chromosome⁵². Cet ensemble de gènes, par comparaison à d'autres bactéries flagellées, apparaît être suffisant pour permettre l'expression d'un flagelle chez *Brucella*.

La question qui se pose donc est la suivante : ces gènes sont-ils cryptiques ?

Des résultats obtenus dans notre laboratoire ont mis en évidence directement ou indirectement une expression de certains gènes flagellaires chez *B. melitensis* 16M indiquant qu'ils ne sont pas cryptiques :

- L'implication des gènes *fliF*, *fliC*, *flgI*, *flhA*, *flgE*, *motB* et *2c2* dans la virulence de la bactérie en modèle murin^{52, 53} (J. Godfroid, CERVA, communication personnelle).

- L'expression des protéines FlgE et FliC ainsi que l'activité du promoteur de *fliF* en phase de latence et en début de phase exponentielle de culture puis disparition de l'expression^(52, S. Léonard thèse en cours).

- L'expression du promoteur de *fliF* au cours d'une infection de cellules HeLa ou de macrophages^(57, 58, 52, S. Léonard thèse en cours).

Ces profils d'expression indiquent l'existence d'un système de régulation. Par ailleurs, d'autres évidences d'une régulation des gènes flagellaires ont été obtenues :

- l'absence d'expression de FlgE et FliC dans une souche mutée par un transposon dans le gène *fliF*⁵².

- l'absence d'une activité du promoteur de *fliF* par une souche mutée dans le gène *2c2* (S. Léonard thèse en cours,⁵²).

Dans ce travail, nous avons abordé la problématique de l'expression d'un flagelle par *B. melitensis* 16M sous trois angles :

1. Une analyse de l'implication de trois régulateurs transcriptionnels prédits, à savoir *2c2*, TetR et VjbR (dont les gènes se retrouvent dans les loci flagellaires) dans l'expression des gènes flagellaires *fliF* (MS-ring), *flgE* (« hook ») et *fliC* (filament).

2. La réalisation de trois constructions plasmidiques, dont deux (pMR10-*pfliF-fliF* et pMR10-*p2c2-2c2*) sont destinées à des tests de complémentation de mutants flagellaires (le mutant *fliF* et le mutant *2c2*), et la troisième (pET15B-*2c2*) à la production d'une forme purifiée de la protéine *2c2*.

3. Une recherche par visualisation au microscope électronique à transmission d'une structure flagellaire à la surface de la bactérie.

Les résultats suivants ont été obtenus :

- 1) Les gènes *2c2* et *vjbR* sont nécessaires à l'activation du promoteur de *fliF* et à l'expression des protéines FlgE et FliC, tandis que *tetR* contribuerait à l'activité de *pfliF* mais dans une moindre mesure.
- 2) Le phénotype correspondant à l'absence d'expression de FlgE par la souche de *B. melitensis* 16M mutée dans *2c2* est complémenté par l'apport en *trans* d'une copie sauvage du gène *2c2*, indiquant que le phénotype n'est pas lié à un effet polaire mais à la seule mutation de *2c2*. Les constructions plasmidiques pMR10-*pfliF*-*fliF* et pET15B-*2c2* sont correctes et prêtes pour une utilisation future.
- 3) *B. melitensis* 16M présente occasionnellement un appendice filamenteux à sa surface en phase de latence et en début de phase exponentielle lorsqu'elle est cultivée dans un milieu bactériologique riche ou appauvri en nutriments.

Quelles sont les perspectives à court et à long terme de ce travail ?

1. Régulation de l'expression des gènes flagellaires

les régulateurs

2c2

Nos résultats démontrent que *2c2* et *VjbR* sont nécessaires à l'activation du promoteur de *fliF*. Il serait intéressant de tester si *2c2* active directement le promoteur de *fliF* en s'y liant et dans ce cas, déterminer par « footprint » le site de fixation de *2c2* dans le promoteur de *fliF*. Ceci sera possible dès que nous disposerons d'une forme purifiée de la protéine *2c2* obtenue en utilisant la construction plasmidique pET15B-*2c2* qui devrait permettre une surexpression de la protéine dans *E. coli* BL21 (DE3). La question de la hiérarchie des régulateurs sera également abordée : existe-t-il une cascade dans laquelle *VjbR* activerait *2c2*, lequel activerait *pfliF* ? Cela nous mène à l'étude de l'expression de *2c2* : est-elle constitutive et *2c2* est-il activé par phosphorylation au moment de l'expression des gènes flagellaires ou son expression est-elle régulée parallèlement à celle de *pfliF* ? La production d'anticorps contre *2c2* permettra de suivre l'expression de cette protéine chez *Brucella*. Comme nous l'avons dit, *2c2* est un régulateur de réponse atypique car l'aspartate cible de la phosphorylation n'est pas présent en position 57. Il serait intéressant de déterminer si *2c2* est effectivement phosphorylé chez *Brucella* et d'identifier le résidu aspartate cible. L'identification de son éventuel partenaire histidine kinase reste à réaliser car aucune des 20 histidines kinases testées contre *2c2* en double hybride dans la levure n'a montrée d'interaction (V. Van Mullem, communication personnelle).

vjbR

VjbR est un régulateur transcriptionnel de la famille LuxR qui possède les résidus impliqués dans la liaison à l'HSL présents chez son homologue TraR. La liaison à l'HSL modifie généralement l'activité des régulateurs de cette famille et conduit à l'induction ou à l'inhibition de l'expression des gènes cibles. *Brucella* produit une C12-HSL mais son effet sur l'activité de *vjbR* reste à étudier. Il sera dès lors intéressant de tester l'effet de l'addition d'HSL synthétique sur l'expression des gènes flagellaires.

R-M. Delrue a montré au laboratoire que VjbR est un activateur transcriptionnel de l'opéron *virB* encodant le système de sécrétion de type IV impliqué dans la virulence de *Brucella*. Il serait intéressant de tester l'expression de VirB dans le mutant *2c2* et également, d'étudier par western blot l'expression de VirB en parallèle à l'expression des protéines flagellaires au cours d'une culture chez la souche sauvage.

Nous devons également montrer que l'expression des protéines FlgE et FliC est restaurée chez le mutant *vjbR* par l'apport d'une copie sauvage de ce gène

tetR

La famille TetR contient des répresseurs. Si TetR a effectivement un rôle dans l'expression flagellaire et qu'il implique un effet de répression, il sera testé en étudiant l'effet de la surproduction de TetR sur l'expression des gènes flagellaires. L'effet de TetR sur l'expression de *vjbR* et de *2c2* serait aussi intéressant à investiguer.

La cascade flagellaire

Les gènes flagellaires sont induits en début de culture et semblent l'être davantage dans un milieu pauvre en nutriments. Le ou les signaux perçus par la bactérie et enclenchant la cascade flagellaire restent à identifier. Étant donné que l'on sait que *Brucella* active *pfliF* dans les cellules eucaryotes, il est logique de tester comme conditions inductrices (ou inhibitrices) l'environnement intracellulaire rencontré par *Brucella*. On sait que le phagosome passe par une phase d'acidification. Ce phagosome serait également pauvre en différents acides aminés et microaérobie ou anaérobie. L'effet d'un stress acide, nutritionnel, anaérobie ou HSL sur l'expression des gènes flagellaires reste à tester. Une fois la cascade enclenchée, *vjbR* et *2c2* pourraient agir simultanément ou plus probablement en série (avec ou sans *tetR*) pour activer les gènes de classe 2 dont *fliF*, *flgE* et *fliC* appartiennent aux classes suivantes (3 ou plus) car leur expression dépend vraisemblablement de la présence de *fliF*. En effet, le mutant *fliF* n'exprime ni FlgE ni FliC⁵⁵.

La construction plasmidique pMR10-*pfliF-fliF* sera utilisée pour compléter le mutant *fliF* afin de vérifier que le phénotype est dû à la seule mutation de *fliF* et non à un effet polaire sur les gènes en aval. Il faudra également tester si *2c2* active directement *fliC* ou *flgE* ou si son effet est indirect via *fliF*.

On ignore, dans le régulon flagellaire le plus proche de *Brucella*, celui de *Sinorhizobium meliloti*, quel régulateur assure l'expression des gènes de classe 3. Chez les autres bactéries étudiées, le passage à la classe 3 s'accompagne d'un changement de facteurs S. Des mutants de facteurs S de *B. melitensis* sont disponibles au laboratoire (M. Delory, thèse en cours). Le facteur S nommé HRPL aurait un effet sur l'expression de FliC et FlgE. Cet effet est en cours d'étude. Chez *C. crescentus* un inhibiteur de la traduction de la flagelline, FlbT, est décrit. Un gène similaire à *flbT* est présent chez *Brucella* mais son rôle dans la traduction de la flagelline reste à investiguer.

La diminution de l'activité de *pfliF* et la disparition de FlgE et FliC sont brutales en phase exponentielle. Chez *C. crescentus*, il semble qu'un système régulateur à deux composants impliquant PleD contrôle la dégradation de FliF (MS-ring) et les parties extérieures (« hook » et filament) sont éjectées. On ignore tout de ces mécanismes chez *Brucella*. A cette phase de croissance il serait intéressant de rechercher la présence de protéines et/ou de la structure flagellaire dans le surnageant de culture.

2. *Brucella* possède-t-elle un flagelle ?

La présence des gènes *mot* et des gènes du C-ring dans les loci flagellaires de *Brucella* indique qu'elle possède tout le matériel génétique pour former un moteur fonctionnel et donc faire tourner un flagelle. Par contre, on remarque l'absence de gènes de chimotactisme, lesquels servent habituellement à orienter le mouvement d'une bactérie dans un gradient d'une substance favorable ou défavorable au microorganisme.

Ces données suggèrent qu'un flagelle potentiel chez *Brucella* ne serait pas utilisé pour un déplacement orienté mais serait impliqué dans la virulence, par exemple pour la sécrétion de facteurs de virulence, ou comme adhésine.

Par observation au microscope électronique à transmission, nous avons visualisé un appendice filamenteux à la surface de plusieurs bactéries cultivées dans les conditions d'expression des gènes flagellaires. Afin de confirmer que les bactéries présentant un appendice filamenteux observées en microscopie électronique sont des *Brucella*, un marquage à l'aide d'anticorps primaires reconnaissant le LPS de *Brucella* et d'anticorps secondaires couplés à des particules d'or colloïdal sera réalisé. Ensuite, afin d'établir si cette structure filamenteuse est ou non un flagelle, un marquage direct à l'aide d'anticorps primaires reconnaissant la flagelline de *Brucella* et d'anticorps secondaires couplés à l'or sera effectué.

En effet, il est envisageable que la structure observée soit un pilus du système de sécrétion de type IV, VirB, sachant que VjbR régule aussi l'expression de ce système.

Remarquons que la rareté des bactéries que nous avons observé présentant cette structure filamenteuse pourrait s'expliquer par sa fragilité. Afin d'en récolter un maximum, on pourrait détacher mécaniquement ces structures des bactéries et les récupérer après ultracentrifugation du surnageant de culture puis les observer et les marquer en microscopie électronique.

Une autre possibilité visant à obtenir un nombre plus élevé de ces structures flagellaires serait d'identifier d'autres conditions de culture de *Brucella* plus favorables à l'expression de ce flagelle potentiel.

Matériel et méthodes

1. Souches bactériennes et plasmides

1. 1. Souches bactériennes

1. 1. 1. Escherichia coli

E. coli DH10B

Cette souche est utilisée pour la transformation par divers plasmides ou produits de ligation. Son génotype est le suivant :

F⁻ *mcrA* D(*mrr-hsdRMS-mcrBC*) 80*dlacZ*DM15 *DlacX*74 *deoR* *recA1* *endA1* *araD*139 D (*ara*, *leu*)7697 *galU* *galK* l⁻ *rpsL* *nupG*.

E. coli DB3.1

Souche comprenant l'allèle *gyrA*462 qui la rend résistante à l'effet toxique de CcdB. Son génotype est le suivant :

F⁻ *gyrA*462 *endA*⁻D(*sr1-recA*) *mcrB* *mrr* *hsd20*(rB⁻,mB⁻) *supE*44 *ara*14 *galK*2 *lacY*1 *proA*2 *rpsL* l⁻ *leu* *mtl*1.

E. coli S17-11 *pir*

La souche d'*E. coli* S17-11 *pir* est résistante à la streptomycine (Sm^R), à la spectinomycine (Sp^R) et au triméthoprim (Tp^R). Cette souche d'*E. coli* possède notamment la caractéristique intéressante suivante:

RP4⁺: l'intégration du plasmide RP4 dans le chromosome bactérien permet le transfert conjugatif d'un plasmide mobilisable (contenant une origine de transfert) de la bactérie S17-1 vers une bactérie receveuse.

1. 1. 2. *Caulobacter crescentus* NA1000

La souche NA 1000 de *Caulobacter crescentus* a été utilisée pour visualiser des flagelles bactériens après coloration négative lors des essais de microscopie électronique (cf. ci-dessous).

1. 1. 3. *Brucella melitensis* 16M Nal^R

La souche de référence utilisée tout au long de ce travail est *B. melitensis* biovar 1 16M, phénotype lisse, rendue résistante à l'acide nalidixique (Nal^R) au laboratoire de biologie moléculaire, FUNDP, Namur. L'agglutination se produit avec un anti-sérum M. Cette souche a été reçue de A. MacMillan et isolée sur le terrain en 1955.

Les souches mutantes de *B. melitensis* 16M 2c2 et *tetR* ont été obtenues par disruption intégrative (V. Haine, communication personnelle), et *vjbR* par délétion (R-M. Delrue, communication personnelle).

1. 2. Plasmides

1. 2. 1. pDONR201

Ce plasmide, commercialisé par Invitrogen, est conçu pour le clonage intermédiaire par le système Gateway de fragments d'ADN d'intérêt. Il contient des sites de recombinaison attP1 et attP2 situés de part et d'autre d'une cassette contenant le gène *ccdB* toxique pour certaines

souches de *E. coli* et un gène de résistance au chloramphénicol. Le plasmide porte en outre un gène de résistance à la kanamycine et une origine de répllication (pUC ori) chez *E. coli*. Il est utilisé dans des réactions BP impliquant l'échange de la cassette contre un fragment d'intérêt muni de sites attB1 et attB2, résultant en un vecteur d'entrée.

1. 2. 2. pMR10-Gateway

Ce plasmide est dérivé du pMR10, auquel ont été rajoutés, sous la dépendance du promoteur Plac, des sites attR1 et attR2 compatibles Gateway de part et d'autre d'une cassette contenant le gène *ccdB*, toxique pour certaines souches de *E. coli*, ainsi qu'un gène de résistance au chloramphénicol (Régis Hallez, thèse en cours). Ces sites permettent l'échange de la cassette avec un fragment d'ADN d'intérêt présent dans un vecteur donneur via réaction LR. Le pMR10 est un plasmide répliatif chez *Brucella spp.* à faible nombre de copies (origine RK2 oriV), possédant un gène de résistance à la kanamycine et un gène de résistance au chloramphénicol.

1. 2. 3. pET15B-Gateway

Ce plasmide est dérivé du pET15B commercialisé par Novagen, auquel ont été rajoutés des sites attR1 et attR2 compatibles Gateway de part et d'autre d'une cassette contenant le gène *ccdB*, toxique pour certaines souches de *E. coli*, ainsi qu'un gène de résistance au chloramphénicol (Régis Hallez, thèse en cours). Ces sites permettent l'échange de la cassette avec un fragment d'ADN d'intérêt présent dans un vecteur donneur via réaction LR. Le pET15B possède un promoteur fort de phage T7 permettant la surexpression d'une protéine d'intérêt chez *E. coli*, ainsi qu'un motif encodant une queue d'histidine permettant la purification de la protéine d'intérêt par chromatographie d'affinité.

2. Milieux de culture et antibiotiques

Milieu Luria Bertani (LB)		Milieu 2YT		Milieu PYE	
Hydrolysate de caséine (peptone)	10g/litre	Mix pour LB liquide	20g/litre	Bactopeptone	2g/litre
NaCl	5g/litre	Hydrolysate de caséine (peptone)	6g/litre	Yeast extract	1g/litre
Yeast extract	5g/litre	Yeast extract	5g/litre	MgSO ₄	1mM
				CaCl ₂	0,5mM

Pour les formes solides des milieux : ajouter 12g/litre (pour LB) ou 1g/litre (pour 2YT) d'agar

Pour 1 litre de milieu pauvre pour <i>Brucella</i>			
NaCl	7,5g	Acide L-glutamique	1,5g
Dipotassium phosphate	10g	Composé 1 (métaux)	1ml
Thiosulfate de sodium	0,1g	Composé2 (vitamines)	1ml
Glycérol	30g	Composé 3 (biotine)	1ml
Acide lactique	5g		

Ajuster le pH à 6,8-7,0

Pour 100ml composé 1		Pour 100ml composé 2		Pour 100ml composé 3	
MgCl ₂ *6H ₂ O	8,330g	Thiamine HCl	20mg	Biotine	0,01g
FeSO ₄ *7H ₂ O	0,050g	Acide nicotinamidique	20mg		
MnCl ₂ *4H ₂ O	0,040g				
Ca pantothenate	0,004g				

Antibiotiques			
Ampicilline	100µg/ml	Chloramphénicol	20µg/ml
Kanamycine	25µg/ml	Acide nalidixique	25µg/ml

3. Manipulations relatives à l'ADN

3. 1. Amplification par PCR

L'ADN doit être dénaturé pour permettre l'hybridation des amorces. Des amorces oligonucléotidiques complémentaires de séquences se trouvant de chaque côté de la région-cible, s'hybrident l'une au brin "sens" et l'autre au brin "anti-sens". Une ADN polymérase thermostable, telle que la *Taq* (Expand High Fidelity-Roche) est alors utilisée pour synthétiser à partir de l'extrémité 3'-OH de chaque amorce un brin d'ADN complémentaire. Un cycle consiste en 3 étapes:

1. dénaturation des brins d'ADN
2. hybridation des amorces
3. élongation (synthèse d'un brin d'ADN complémentaire).

En répétant ce cycle, on augmente de façon exponentielle le nombre de copies du fragment cible. La T_m (Température de melting) des amorces se calcule de la façon suivante (pour des oligos d'une taille inférieure à 20 bases) : 4°C sont comptabilisés pour les bases G et C et 2°C pour les bases A et T: $T_m = 4(G+C) + 2(A+T)$.

Mode opératoire

Mélange de réaction réalisé dans un microtube:

- ADN génomique (1-10ng) 1ml
- Tampon d'ADN polymérase 10x 5ml
- dNTP (20mM chacun) 2ml
- Primer 1 0,1-0,6mM
- Primer 2 0,1-0,6mM
- Polymérase (2U/ml) 0,5-1ml
- Porter à 50ml avec de l'eau bidistillée stérile.

Programme utilisé pour les amplifications PCR

- Dénaturation de 5 minutes à 94°C.
- 30 cycles d'amplification divisés en 3 étapes:
 - 30 sec. à 94°C pour la dénaturation
 - 30 sec. à 50°C pour l'hybridation
 - 1 min 30 sec. pour *pflIF-fliF* et 45 sec. pour *p2c2-2c2* à 72°C pour la polymérisation
- Elongation finale de 7 minutes à 72°C

3.2. Electrophorèse en gel d'agarose

L'électrophorèse en gel d'agarose sépare les fragments d'ADN en fonction de leur taille. Le pourcentage d'agarose à utiliser sera inversement proportionnel aux tailles des fragments à séparer.

La taille des fragments est estimée en faisant co-migrer des fragments d'ADN de taille connue. Nous avons utilisé comme marqueur de taille l'HyperLadder de Bioline.

Les fragments d'ADN sont visualisés au moyen du bromure d'éthidium (BrEth). Celui-ci se lie à l'ADN bicaténaire en s'intercalant entre les bases de la double hélice. Etant fluorescent, le bromure d'éthidium marque l'ADN et celui-ci est visible sous illumination UV. La fluorescence d'un fragment d'ADN est proportionnelle à sa taille, ainsi qu'à la quantité d'ADN présent. Ainsi, en connaissant la quantité d'ADN des marqueurs de taille, on peut estimer la quantité d'ADN du fragment par comparaison de l'intensité de la fluorescence.

Mode opératoire

- Porter à ébullition un volume approprié de tampon TAE additionné d'agarose, jusqu'à obtention d'une solution limpide.
- Quand la solution est refroidie, ajouter 5ml de BrEth, et couler la solution sur un support *ad hoc* muni d'un peigne.
- Immerger le gel dans une cuve d'électrophorèse remplie de tampon.
- Préparer les échantillons en ajoutant 1/10 de solution d'alourdisseur.
- Déposer les échantillons dans les puits et effectuer la migration au voltage désiré.
- Visualiser le gel sous UV (transilluminateur longueur d'onde à 302 nm).

Bromure d'éthidium	Solution d'alourdisseur	Tampon TAE 50x
Solution de 2mg/ml	glycerol 50%	Tris-HCl pH 8,0 40mM
	EDTA 100mM	EDTA 50mM
	SDS 1%	Acide acétique glacial
	Bleu de bromophénol	57,1ml/litre

3. 3. Purification de fragments d'ADN extraits d'un gel d'agarose

Cette technique permet de récupérer un fragment d'ADN d'un gel d'agarose isolé au cours de l'électrophorèse. Le kit utilisé est le Concert Rapid Gel Extraction System (GibcoBRL).

- Exciser le fragment d'intérêt du gel à l'aide d'un scalpel. Mettre le morceau d'agar dans un eppendorf. Peser le morceau d'agar.
- Ajouter 30ml de tampon L1 par 10 mg de gel.
- Incuber à 50°C pendant 15 min. en agitant toutes les trois minutes.
- Déposer le contenu dans une cartouche à centrifuger, préalablement placée dans un tube collecteur.
- Centrifuger 1 min.
- Eliminer le liquide passé au travers de la colonne et remplacer la colonne de nouveau dans le tube collecteur.
- Ajouter 700µl de tampon L2 de lavage contenant de l'éthanol dans la colonne.
- Laisser agir 5 min. Centrifuger 1 min. et éliminer le liquide passé au travers de la colonne.
- Centrifuger à nouveau 1 min. de manière à éliminer toute trace d'éthanol.
- Placer la colonne dans un eppendorf. Eluer l'ADN avec 50µl de tampon TE préchauffé, placé au centre de la colonne pendant une minute. Centrifuger 1 min. pour récolter l'éluat.
- Conserver à -20°C.

3. 4. Clonage par la technique Gateway

Le système GATEWAY[®] est basé sur les réactions de recombinaison intervenant lors de l'intégration et de l'excision du phage λ dans le génome d'*E. coli*. L'intégration implique la

recombinaison entre les sites attP et attB présents respectivement dans l'ADN du phage λ et dans le génome bactérien. Cette réaction génère un génome phagien intégré compris entre les sites attR et attL néoformés. La réaction d'intégration (réaction BP) requiert deux enzymes : l'intégrase (Int) encodée par le génome du phage ainsi que l'IHF (Integration Host Factor) d'origine bactérienne communément appelée BP clonase. Cette intégration est réversible et l'ADN du phage peut être excisé du génome bactérien par recombinaison entre les sites attR et attL. Cette réaction d'excision est appelée réaction LR. Elle nécessite les facteurs Int et IHF ainsi qu'une protéine additionnelle d'origine phagique (Xis) communément appelée LR clonase. Ce système a été adapté de sorte à permettre des clonages faciles en laboratoire. La perte d'une cassette contenant le gène *ccdB* toxique pour certaines souches de *E. coli* lors des recombinaisons est un moyen de sélection des clones recombinants.

3. 4. 1. Restriction du pDONR201

Afin d'augmenter l'efficacité de la réaction BP suivante, une linéarisation du pDONR201 par l'enzyme de restriction NcoI doit être appliquée.

3. 4. 2. Réaction BP

La réaction BP permet le transfert d'un fragment d'ADN d'intérêt qui possède des sites attB1 et attB2 à ses extrémités dans le vecteur pDONR201 pour obtenir le vecteur d'entrée.

3. 4. 3. Réaction LR

La réaction LR permet le transfert d'un fragment d'intérêt d'un vecteur d'entrée vers un vecteur de destination.

Réaction BP	Réaction LR
150ng de pDONR201 restreint NcoI	3ml de vecteur d'entrée
4ml de réaction PCR du gène d'intérêt	3ml de vecteur de destination
2ml de tampon de dilution BP	2ml de tampon de dilution LR
2ml d'enzyme clonase BP	2ml d'enzyme clonase LR
1ml d'H ₂ O bidistillée	
placer à 25°C pendant 24h. puis stopper la réaction en incubant 10 min. à 37°C avec 2ml de protéinase K	placer à 25°C pendant 24h.

3. 5. Transformation bactérienne

La transformation bactérienne consiste à faire entrer de l'ADN exogène (dans ce cas, un plasmide) dans une bactérie. Ceci nécessite un traitement préalable rendant la paroi et la membrane bactérienne perméables à l'ADN : la bactérie est alors dite compétente.

Un choc thermique ou électrique doit alors être appliqué pour induire la capture de l'ADN par la cellule.

3. 5. 1. Transformation par choc thermique

Des bactéries gram-négatives *E. coli* en début de phase exponentielle de croissance sont rendues artificiellement compétentes par passage dans une solution hypotonique de chlorure de calcium (CaCl₂). Celui-ci déstabilise la paroi de la bactérie, qui gonfle alors en prenant l'aspect d'un sphéroblaste. L'ADN plasmidique ajouté forme avec le calcium un complexe résistant aux désoxyribonucléases. Ce complexe est supposé adhérer à la bactérie. Les bactéries sont ensuite soumises à un choc thermique qui permet au complexe de rentrer dans la cellule. Cette méthode a été employée lors de l'utilisation de la souche *E. coli* S17-11 pir.

Transformation des cellules compétentes

- Ajouter environ 10ml de mélange de ligation ou 10 à 100ng d'ADN à 50 à 150ml de cellules compétentes.
- Déposer 30 min. sur glace.
- Réaliser un choc thermique de 2 min. à 42°C.
- Ajouter 900ml de LB liquide.
- Incuber de 30 min. à 1 h. à 37°C.
- Etaler sur boîtes de milieu sélectif et incuber une nuit à 37°C.

Notons que le temps d'incubation en milieu riche non sélectif permet aux bactéries de régénérer une paroi normale et aux gènes de résistance introduits de s'exprimer. Les transformants sont ensuite isolés par culture sur milieu sélectif.

3. 5. 2. Transformation par choc électrique (électroporation)

Le principe visant à rendre les cellules perméables est ici le même que dans le cas du choc thermique, sauf que la solution hypotonique n'est pas du chlorure de calcium, mais de l'eau bidistillée. Cette méthode a été employée lors de l'utilisation de la souche *E. coli* DH10B.

Préparation des cellules électrocompétentes

- Inoculer 1 litre de LB liquide sélectif avec 1/200 du volume d'une culture fraîche de bactéries *E. coli* DH10B.
- Incuber les bactéries à 37°C sous forte agitation jusqu'à une D.O. de 0,5 à 1 à 600 nm (phase mi-log de croissance).
- Placer la culture sur glace, centrifuger à 4°C à 4000 rpm pendant 15 min. (Sorvall).
- Eliminer le surnageant. Resuspendre le culot dans 1 litre d'eau bidistillée stérile froide. Centrifuger comme précédemment.
- Resuspendre dans 500ml d'eau bidistillée stérile froide et centrifuger.
- Resuspendre dans 20ml d'eau bidistillée froide contenant 10% de glycérol.
- Centrifuger.
- Resuspendre dans un volume final de 2ml d'eau bidistillée stérile froide contenant 10% de glycérol. La concentration cellulaire est d'environ $1 \text{ à } 3 \cdot 10^{10}$ cellules/ml.
- Cette suspension peut être aliquotée sur glace et conservée à -80°C (pendant environ 6 mois).

Electroporation

- Laisser dégeler les cellules électrocompétentes sur glace.
- Placer dans un eppendorf stérile et froid (sur glace), 1µl d'ADN plasmidique ou au maximum 10µl d'un mélange de ligation et y ajouter 100µl de cellules compétentes.
- Mélanger délicatement et placer la solution 1 min. sur glace.
- Transférer le contenu de l'eppendorf dans une cuvette d'électroporation (0,2cm) préalablement placée sur glace.
- Placer la cuvette dans l'électroporateur (BIORAD Gene PulserTM).
- Régler l'appareil sur:
capacitance 25µF
résistance 200Ohms
différence de potentiel 2,5Kv
- Faire le choc électrique.

- Ajouter rapidement 1ml de milieu riche 2YT.
- Transférer dans un eppendorf et laisser 1 h. à 37°C.
- Etaler sur milieu sélectif (100 à 250µl/boîte) et incubé une nuit à 37°C.

3. 6. Minipréparation d'ADN plasmidique

Une minipréparation comprend 5 étapes : la lyse alcaline des bactéries, la précipitation des protéines et des débris cellulaires, la précipitation de l'ADN plasmidique, le lavage de l'ADN plasmidique et sa resuspension.

- Ensemencer 5ml de milieu liquide (LB + antibiotiques) avec une colonie isolée.
- Incuber la culture liquide une nuit à 37°C sous forte agitation.
- Centrifuger 1,5ml de la culture dans un eppendorf (pendant 5 min. à 12500 rpm) et éliminer le surnageant.
- Resuspendre le culot bactérien dans 300µl de P1 (RNase A 100 mg/ml, Tris-HCL 50 mM pH 8.0, EDTA 10mM, à conserver à 4°C).
- Ajouter 300µl de P2 (NaOH 200mM, SDS 1%, à conserver à température ambiante) et mélanger doucement en retournant l'eppendorf, incubé 5 min. à température ambiante.
- Ajouter 300µl de P3 (Kac 3.0M pH 5,5, à conserver à 4°C) et mélanger doucement en retournant, incubé 10 min. sur glace.
- Centrifuger 15 min. à 4°C (à 12500 rpm) et récupérer le surnageant.
- Précipiter l'ADN en ajoutant 0,7 volume d'isopropanol, agiter vigoureusement.
- Centrifuger 15 min. à 4°C (à 12500 rpm), éliminer le surnageant.
- Laver l'ADN en ajoutant 300µl d'éthanol 70% et centrifuger 5 min. à 4°C (à 12500 rpm). Éliminer prudemment l'éthanol.
- Sécher le culot d'ADN.

Resuspendre dans 30µl d'H₂O bidistillée stérile.

3. 7. Restriction d'ADN plasmidique

Le clivage de l'ADN bicaténaire à des sites précis se fait par des endonucléases de restriction qui reconnaissent de courtes séquences, souvent palindromiques, de 4 à 6 paires de bases.

- Prélever xml d'ADN à restreindre en suspension dans de l'eau bidistillée.
- Ajouter 1/10^{ème} de tampon de restriction 10x, associé à l'enzyme.
- L'enzyme de restriction doit constituer au maximum 1/10^{ème} du volume final c-à-d. entre 2 et 10 unités d'enzyme par mg d'ADN (1 unité correspondant à la quantité d'enzyme nécessaire pour restreindre complètement 1mg d'AD du phage λ en 1 h. à 37°C dans un volume de 25µl).
- Amener au volume final avec de l'eau bidistillée.
- Incuber le mélange au minimum 1h30 à température optimale pour l'enzyme (souvent 37°C).

3. 8. Séquençage de l'ADN

Le principe est une amplification d'ADN par PCR avec assimilation de didéoxyribonucléotides marqués à la fluorescéine. Chacun de ces nucléotides possède son marquage propre (sa longueur d'onde d'émission), ce qui rend possible la lecture à partir d'une seule réaction PCR. Ce type de réaction permet par la suite l'utilisation d'un séquenceur automatique.

La réaction de PCR de séquençage est basée sur le principe de Sanger (1977). L'incorporation des didéoxyribonucléotides arrête la réaction de polymérisation ce qui permet d'obtenir une population de brins tronqués qui représente la séquence d'ADN.

Une réaction de PCR est réalisée sur le fragment d'ADN.

La concentration en ADN matrice doit être de 1 à 100ng pour un produit PCR et de 200 à 500ng pour de l'ADN plasmidique. Lorsqu'on utilise un produit PCR, une purification préalable est nécessaire, elle permet d'éliminer les amorces et les nucléotides qui interagiraient avec la réaction de séquençage.

La quantité d'amorce doit être de 3.2pM.

Les produits PCR sont séparés suivant leur taille par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence d'urée. Le résultat du gel est détecté par un système optique relié à un ordinateur.

4. Conjugaison bactérienne

La conjugaison bactérienne entre bactéries gram-négatives est un transfert latéral de matériel génétique. La bactérie donneuse transfère un plasmide conjugatif vers la bactérie receveuse. La conjugaison se fait grâce à un contact entre bactéries. La souche donneuse possède le plasmide RP4 intégré dans son chromosome. Ce plasmide code pour les protéines nécessaires au transfert conjugatif.

- Préléver des colonies de *B. melitensis* 16M et resuspendre dans 150µl de NaCl 0,9%.
- Etaler ces 150µl sur une boîte de Pétri contenant du milieu 2YT Nal trois à quatre jours avant la conjugaison.
- La veille du jour de la conjugaison, ajouter sur la boîte de Pétri 3ml de NaCl 0,9% et racler les colonies. Prélever 1ml de la suspension bactérienne et la diluer 10x dans du NaCl 0,9%.
- Prendre 1ml pour ensemer 9ml de 2YT liquide contenant de l'acide nalidixique.
- Ensemencer 10ml de LB liquide avec les souches d'*E. coli* S17.
- Avant la conjugaison, laver les bactéries pour éliminer les antibiotiques du milieu de culture en centrifugeant 15 min. à 2500 rpm et resuspendre dans du milieu sans antibiotique, le culot bactérien dans 1/10 du volume de la culture de départ.
- Placer un filtre stérile 0,22µm de 82mm de diamètre sur une boîte de Pétri contenant du 2YT, y déposer 100ml de culture de *B. melitensis* 16M et 100ml d'*E. coli* S17 lavées et resuspendues.
- Mélanger et étaler les gouttes de bactéries sur la totalité du filtre.
- Laisser incuber au moins 1 h. à 37°C.
- Récupérer les bactéries sur le filtre dans 1ml de milieu.
- Etaler 100µl des différentes dilutions sur un milieu 2YT sélectif.
- Incuber 3-4 jours à 37°C.

5. Dosage enzymatique de la b-galactosidase sur Brucella

Le dosage est réalisé sur une souche exprimant le gène rapporteur *lacZ*.

Une culture est au préalable inoculée à une D.O. à 600 nm initiale de 0,05 à partir d'une préculture fraîche, dans du milieu 2YT contenant les antibiotiques adéquats, et placée à 37°C sous agitation. Des échantillons sont prélevés aux temps de culture souhaités.

Solutions

Z buffer : pour 500ml

- | | |
|---|--------|
| - Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O | 8,05g |
| - NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O | 2,75g |
| - KCl | 0,375g |

- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,123g

Mettre à pH7.

Conserver à 4°C et ajouter 2,7ml/ml de b-mercaptoéthanol le jour de l'utilisation.

ONPG : dissoudre 200mg d'o-nitrophenylb-D-galactopyranoside dans 50ml de Z buffer en vortexant pendant 5 min.

Aliquoter et conserver à -20°C.

Procédure

- Prélever 1ml de culture en cuvette de spectrophotomètre et prendre la D.O. à 600 nm.
- Prélever 2ml de culture en eppendorf type 2 ml pour le dosage.
- Centrifuger à 13000 rpm pendant 5 min.
- Rapidement et délicatement éliminer le surnageant (aspirer).
- Resuspendre le culot dans 1200ml de Z buffer (+ b-mercaptoéthanol) (= dilution 0,6x).
- Déposez 200ml de chaque resuspension dans 800ml de Z buffer (= dilution 3x).
- Ajouter : - 3 gouttes de chloroforme
- 2 gouttes de SDS 0,1 %.
- Vortexer chaque tube pendant 10 sec.
- Déposez 200ml d'ONPG dans les tubes et incubé chaque tube durant 4 min. à 28°C.
- Stopper la réaction en ajoutant 500ml de Na_2CO_3 1M par tube.
- Centrifuger à 13000 rpm pendant 5 min.
- Récupérer 1ml de surnageant en cuvette de spectrophotomètre et prendre D.O. à 420 nm.
- Exprimer les résultats sous forme d'unités Miller selon la formule:
$$\left(\frac{\text{D.O.}_{420\text{nm}} \times 1000}{\text{D.O.}_{600\text{nm}} \times \text{temps incubation en minutes}} \right) \times \text{facteur de dilution.}$$

6. Western blotting sur Brucella

6. 1. Préparation d'extraits protéiques totaux

Une culture est au préalable inoculée à une D.O. à 600 nm initiale de 0,05 à partir d'une préculture fraîche, dans du milieu 2YT contenant les antibiotiques adéquats, et placée à 37°C sous agitation. Des échantillons sont prélevés aux temps de culture souhaités, la D.O. à 600nm est mesurée, et les bactéries tuées par une incubation de 2h. dans un bain à 80°C. Ensuite, les échantillons sont centrifugés à 4000 rpm durant 20 min., le surnageant éliminé et le culot resuspendu dans du PBS 1x dans un volume tel que la D.O. à 600nm finale soit égale à 3.

Conserver à -20°C.

6. 2. Western blotting

6. 2. 1. Electrophorèse en gel polyacrylamide dénaturant (SDS-PAGE)

Cette étape sert à séparer les protéines contenues dans l'échantillon en fonction de leur poids moléculaire.

Préparer le running gel comme indiqué ci-dessous puis couler la solution entre deux plaques de verre préalablement fixées sur un support. Recouvrir d'isopropanol la surface en contact avec l'air le temps de la polymérisation. Préparer ensuite le stacking gel, le couler sur le running gel et mettre un peigne le temps de la polymérisation.

	Pour 20ml de running gel à 12% de polyacrylamide	Pour 8ml de stacking gel
H ₂ O bidistillée	8,4ml	4,76ml
38,5% Acrylamide mix (37,5 :1)	6,2ml	1,04ml
1,5M Tris (pH8,8)	5ml	2ml

SDS 10%	0,2ml	0,08ml
APS 10%	0,2ml	0,08ml
TEMED	0,008ml	0,008ml

Bouillir pendant 10 min. 20ml de chaque échantillon additionné de bleu 5x, puis charger dans les puits du gel. Mettre un marqueur de poids moléculaire dans un puits (BioRad prestained SDS-PAGE standards low range). Faire migrer dans du tampon SDSPAGE1x à 200 volts, 30mA, 100watts.

Pour 10ml de bleu de chargement 5x		Pour 1 litre de tampon SDSPAGE 10x	
Glycérol	5ml	Tris base	30,35g
b-mercaptoéthanol	2,5ml	Glycine	144g
SDS	1g	SDS	10g
Tris 312,5mM pH6,8 solution 1M	3,125ml		
Bleu de Bromophénol	0,5mg		

6. 2. 2. Transfert sur membrane de nitrocellulose

Après migration dans le gel, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose au moyen d'un appareil de transfert (semi dry) (Panther Semi-dry Electrobloetter, model HEP1 OWL). Un courant électrique traverse le gel et la membrane pris en sandwich entre des papiers Whatman imbibés de Towbin buffer. Appliquer 13volts, 3mA/cm² de membrane, et 50watts, pendant 1 h.

Pour 1 litre de Towbin buffer	
Tris base	5,8g
Glycine	2,9g
SDS	0,37g
Methanol	200ml

6. 2. 3. Immunodétection

Après transfert, la membrane va être mise en présence d'anticorps primaires spécifiques des protéines de *Brucella* étudiées, puis d'anticorps secondaires capables de se fixer aux anticorps primaires. Ces derniers sont conjugués à la peroxydase, une enzyme qui catalyse une réaction produisant de la lumière, laissant alors une empreinte sur un film autoradiographique.

Etape préliminaire de "blocking"

Avant de mettre en présence les anticorps primaires, une étape préliminaire consiste à saturer les sites non spécifiques de ces anticorps sur la membrane, pour éviter un bruit de fond important lors de la révélation. Des protéines de lait sont utilisées à cette fin. Elle ne seront déplacées que dans les zones de reconnaissance spécifiques de l'anticorps lors de la compétition avec ceux-ci. La membrane est incubée dans la solution de blocking au minimum 1 h., ou bien toute la nuit à 4°C. Trois lavages de 10 min. seront effectués ensuite.

Pour 1 litre de PBS 10x	
KH ₂ PO ₄	2g
Na ₂ HPO ₄	11,49g
NaCl	80g

KCl	2g
Mettre à pH 7,4	

Pour obtenir 1 litre de PBS 1x : 100ml PBS 10x + 900ml H₂O bidistillée

Pour 100ml de solution de blocking		Pour 1 litre de solution de lavage	
Lait en poudre	5g	Tween20	500ml
Tween20	50ml	PBS 1x	1 litre
PBS 1x	Pour mettre à volume		

Mise en présence de l'anticorps primaire

Pour détecter les monomères du coude ou de la flagelline de *B. melitensis* 16M, nous disposons de polysérums de lapins, que nous diluons 2000x. La membrane est mise en présence de solution d'anticorps primaires durant 1h30 sous agitation. Trois lavage de 10 min. sont ensuite effectués dans la solution de lavage.

Pour 100ml de solution d'anticorps primaires		Pour 100ml de solution d'anticorps secondaires	
Lait en poudre	1g	Lait en poudre	1g
Tween20	50ml	Tween20	50ml
PBS 1x	Pour ajuster le volume	PBS 1x	Pour ajuster le volume
Polysérum de lapin	50ml	Anti-rabbit HRP	20ml

Mise en présence de l'anticorps secondaire

Pour détecter les anticorps primaires issus du sérum d'un lapin nous utilisons un anticorps anti-rabbit couplés HRP (Horeseradish Peroxydase) une enzyme permettant un dégagement de lumière par l'oxydation d'un substrat peracide (le luminol) en un composé oxydé. Cet anticorps est dilué 5000x et mis en présence de la membrane durant 1h30 sous agitation. Trois lavage de 10 min. sont ensuite effectués dans la solution de lavage.

Révélation

La technique de détection utilise les réactifs ECL (Amersham Pharmacia Biotech) et se déroule en chambre noire.

La membrane est mise en présence d'un mélange en volume égal de deux solutions: S1 et S2. Ce volume est fonction de la surface à couvrir: surface en cm² x 0.125ml.

Mélanger S1 et S2 et en recouvrir la membrane sur la face où les protéines ont été transféré.

Incuber durant 1 min.

Oter la solution de détection et placer la membrane recouverte d'un film plastique (type SaranWrap) dans une cassette de révélation, et exposer à un film autoradiographique selon différentes durées: 15 sec., 30 sec., 60 sec.. Notons qu'une fois S1 et S2 mélangées, l'activité maximale de la peroxydase a lieu de une à cinq minutes après le mélange puis elle décroît en fonction du temps.

Révéler les bandes par un bain de révélateur: le film est plongé dans la cuve jusqu'à ce qu'apparaissent des bandes ou, le cas échéant, les bords de la membrane.

Ensuite passer le film une dizaine de secondes dans le fixateur. Rincer abondamment à l'eau de ville puis laisser sécher.

Garder la membrane pour positionner les bandes en fonction des puits chargés et pour avoir des renseignements quant à l'échelle de taille.

7. Observation de bactéries colorées négativement au microscope électronique

7. 1. Préparation des échantillons

Une culture de *B. melitensis* 16M est au préalable inoculée à une D.O. à 600 nm initiale de 0,05 à partir d'une préculture fraîche, dans du milieu 2YT ou dans du milieu appauvri contenant de l'acide nalidixique, et placée à 37°C sous agitation. Des échantillons sont prélevés aux temps de culture souhaités.

Solutions

- PBS 1x : (cf. point 6. 2. 3.)

- PFA4% : mettre 8g de paraformaldéhyde dans 200ml de PBS 1x, placer à 65°C jusqu'à obtention d'une solution translucide, puis aliquoter et conserver à -20°C.

Procédure

Prélever 100ml d'échantillon:

- centrifuger à 1000 rpm 20 min.
- éliminer le surnageant et resuspendre très délicatement dans 10ml de PBS1x filtré (0,22mm).
- centrifuger à 1000 rpm 20 min.
- éliminer le surnageant, resuspendre dans 50 à 100ml de PFA 4% et incuber 20 min. à température ambiante.

Conserver à 4°C.

7. 2. Coloration des échantillons

- Déposer une goutte (20ml) d'échantillon sur une grille de Formvar-carbone

Copper/Palladium.

- Laisser sécher à l'air durant 2 min.

- Déposer une goutte d'acétate d'uranyle 1% pH4,23 ou d'acide phosphotungstique 1% pH7,4 sur l'échantillon.

- Laisser imprégner pendant 1 min. dans le cas de l'acétate d'uranyle ou pendant 20 sec. dans le cas de l'acide phosphotungstique.

- Aspirer le superflu de la goutte à l'aide d'un papier absorbant.

- Visualiser au microscope électronique à transmission TECNAI 10 PHILIPS.

Bibliographie

1. Jenal, U. Signal transduction mechanisms in *Caulobacter crescentus* development and cell cycle control. *FEMS Microbiol Rev.* **24**, 177-91 (2000).
2. Macnab, R. M. *Flagella and motility*. In *Escherichia coli and Salmonella* (ASM Press, Washington, 1996).
3. Macnab, R. M. How Bacteria Assemble Flagella. *Annu Rev Microbiol* (2003).
4. Aldridge, P. & Hughes, K. T. Regulation of flagellar assembly. *Curr Opin Microbiol* **5**, 160-5 (2002).
5. Scharf, B. Real-time imaging of fluorescent flagellar filaments of *Rhizobium lupini* H13-3: flagellar rotation and pH-induced polymorphic transitions. *J Bacteriol* **184**, 5979-86 (2002).
6. Thomas, D., Morgan, D. G. & DeRosier, D. J. Structures of bacterial flagellar motors from two FliF-FliG gene fusion mutants. *J Bacteriol* **183**, 6404-12 (2001).
7. Samatey, F. A. et al. Structure of the bacterial flagellar protofilament and implications for a switch for supercoiling. *Nature* **410**, 331-7 (2001).
8. Platzer, J., Sterr, W., Hausmann, M. & Schmitt, R. Three genes of a motility operon and their role in flagellar rotary speed variation in *Rhizobium meliloti*. *J Bacteriol* **179**, 6391-9 (1997).
9. Mangan, E. K. et al. FliB couples flagellum assembly to gene expression in *Caulobacter crescentus*. *J Bacteriol* **181**, 6160-70 (1999).
10. Chilcott, G. S. & Hughes, K. T. Coupling of flagellar gene expression to flagellar assembly in *Salmonella enterica* serovar typhimurium and *Escherichia coli*. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**, 694-708 (2000).
11. Muramoto, K., Makishima, S., Aizawa, S. & Macnab, R. M. Effect of hook subunit concentration on assembly and control of length of the flagellar hook of *Salmonella*. *J Bacteriol* **181**, 5808-13 (1999).
12. Pizarro-Cerda, J. et al. *Brucella abortus* transits through the autophagic pathway and replicates in the endoplasmic reticulum of nonprofessional phagocytes. *Infect Immun* **66**, 5711-24 (1998).
13. Karlinsey, J. E., Pease, A. J., Winkler, M. E., Bailey, J. L. & Hughes, K. T. The flk gene of *Salmonella typhimurium* couples flagellar P- and L-ring assembly to flagellar morphogenesis. *J Bacteriol* **179**, 2389-400 (1997).
14. Young, G. M., Schmiel, D. H. & Miller, V. L. A new pathway for the secretion of virulence factors by bacteria: the flagellar export apparatus functions as a protein-secretion system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 6456-61 (1999).
15. Schoenhals, G. J. & Macnab, R. M. Physiological and biochemical analyses of FlgH, a lipoprotein forming the outer membrane L ring of the flagellar basal body of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **178**, 4200-7 (1996).
16. Minamino, T. & MacNab, R. M. Interactions among components of the *Salmonella* flagellar export apparatus and its substrates. *Mol Microbiol* **35**, 1052-64 (2000).
17. Nambu, T. & Kutsukake, K. The *Salmonella* FlgA protein, a putative periplasmic chaperone essential for flagellar P ring formation. *Microbiology* **146** (Pt 5), 1171-8 (2000).

18. Hirano, T., Minamino, T., Namba, K. & Macnab, R. M. Substrate specificity classes and the recognition signal for Salmonella type III flagellar export. *J Bacteriol* **185**, 2485-92 (2003).
19. Nambu, T., Minamino, T., Macnab, R. M. & Kutsukake, K. Peptidoglycan-hydrolyzing activity of the FlgJ protein, essential for flagellar rod formation in Salmonella typhimurium. *J Bacteriol* **181**, 1555-61 (1999).
20. Hirano, T., Minamino, T. & Macnab, R. M. The role in flagellar rod assembly of the N-terminal domain of Salmonella FlgJ, a flagellum-specific muramidase. *J Mol Biol* **312**, 359-69 (2001).
21. Sharp, L. L., Zhou, J. & Blair, D. F. Features of MotA proton channel structure revealed by tryptophan-scanning mutagenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 7946-50 (1995).
22. Sato, K. & Homma, M. Multimeric structure of PomA, a component of the Na⁺-driven polar flagellar motor of vibrio alginolyticus. *J Biol Chem* **275**, 20223-8 (2000).
23. Berg, H. C. The Rotary Motor of Bacterial Flagella. *Annu Rev Biochem* (2002).
24. Tasteyre, A., Barc, M. C., Collignon, A., Boureau, H. & Karjalainen, T. Role of FliC and FliD flagellar proteins of Clostridium difficile in adherence and gut colonization. *Infect Immun* **69**, 7937-40 (2001).
25. Kalir, S. et al. Ordering genes in a flagella pathway by analysis of expression kinetics from living bacteria. *Science* **292**, 2080-3 (2001).
26. Soutourina, O. et al. Multiple control of flagellum biosynthesis in Escherichia coli: role of H-NS protein and the cyclic AMP-catabolite activator protein complex in transcription of the flhDC master operon. *J Bacteriol* **181**, 7500-8 (1999).
27. Tomoyasu, T. et al. The ClpXP ATP-dependent protease regulates flagellum synthesis in Salmonella enterica serovar typhimurium. *J Bacteriol* **184**, 645-53 (2002).
28. Tomoyasu, T., Takaya, A., Isogai, E. & Yamamoto, T. Turnover of FlhD and FlhC, master regulator proteins for Salmonella flagellum biogenesis, by the ATP-dependent ClpXP protease. *Mol Microbiol* **48**, 443-52 (2003).
29. Aldridge P, H. K. How and when are substrates selected for type III secretion? *Trends Microbiol.* **9**, 209-14 (2001).
30. Fraser, G. M., Bennett, J. C. & Hughes, C. Substrate-specific binding of hook-associated proteins by FlgN and FliT, putative chaperones for flagellum assembly. *Mol Microbiol* **32**, 569-80 (1999).
31. Karlinsey, J. E., Lonner, J., Brown, K. L. & Hughes, K. T. Translation/secretion coupling by type III secretion systems. *Cell* **102**, 487-97 (2000).
32. Kutsukake K, I. T., Yamamoto S. Two novel regulatory genes, fliT and fliZ, in the flagellar regulon of Salmonella. *Genes Genet Syst.* **74**, 287-92 (1999).
33. Karlinsey, J. E., Tsui, H. C., Winkler, M. E. & Hughes, K. T. Flk couples flgM translation to flagellar ring assembly in Salmonella typhimurium. *J Bacteriol* **180**, 5384-97 (1998).
34. Scharf, B., Schuster-Wolff-Buhring, H., Rachel, R. & Schmitt, R. Mutational analysis of the Rhizobium lupini H13-3 and Sinorhizobium meliloti flagellin genes: importance of flagellin A for flagellar filament structure and transcriptional regulation. *J Bacteriol* **183**, 5334-42 (2001).
35. Scharf, B. & Schmitt, R. Sensory transduction to the flagellar motor of Sinorhizobium meliloti. *J Mol Microbiol Biotechnol* **4**, 183-6 (2002).
36. Quon, K. C., Marczynski, G. T. & Shapiro, L. Cell cycle control by an essential bacterial two-component signal transduction protein. *Cell* **84**, 83-93 (1996).

-
37. Wu, J., Ohta, N. & Newton, A. An essential, multicomponent signal transduction pathway required for cell cycle regulation in *Caulobacter*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 1443-8 (1998).
 38. Wingrove, J. A. & Gober, J. W. Identification of an asymmetrically localized sensor histidine kinase responsible for temporally and spatially regulated transcription. *Science* **274**, 597-601 (1996).
 39. Muir, R. E. & Gober, J. W. Regulation of late flagellar gene transcription and cell division by flagellum assembly in *Caulobacter crescentus*. *Mol Microbiol* **41**, 117-30 (2001).
 40. Anderson, P. E. & Gober, J. W. FlbT, the post-transcriptional regulator of flagellin synthesis in *Caulobacter crescentus*, interacts with the 5' untranslated region of flagellin mRNA. *Mol Microbiol* **38**, 41-52 (2000).
 41. Aldridge, P. & Jenal, U. Cell cycle-dependent degradation of a flagellar motor component requires a novel-type response regulator. *Mol Microbiol* **32**, 379-91 (1999).
 42. Hecht, G. B. & Newton, A. Identification of a novel response regulator required for the swarmer-to-stalked-cell transition in *Caulobacter crescentus*. *J Bacteriol* **177**, 6223-9 (1995).
 43. Sourjik V, M. P., Scharf B, Schmitt R. VisN and VisR are global regulators of chemotaxis, flagellar, and motility genes in *Sinorhizobium* (*Rhizobium*) *meliloti*. *J Bacteriol*. **182**, 782-8 (2000).
 44. DelVecchio VG, K. V., Redkar RJ, Patra G, Mujer C, Los T, Ivanova N, Anderson I, Bhattacharyya A, Lykidis A, Reznik G, Jablonski L, Larsen N, D'Souza M, Bernal A, Mazur M, Goltsman E, Selkov E, Elzer PH, Hagius S, O'Callaghan D, Letesson JJ, Haselkorn R, Kyrpides N, Overbeek R. The genome sequence of the facultative intracellular pathogen *Brucella melitensis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 443-8 (2002).
 45. Paulsen, I. T. et al. The *Brucella suis* genome reveals fundamental similarities between animal and plant pathogens and symbionts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 13148-53 (2002).
 46. O'Callaghan. *Brucella. Animal and ectoparasitic source infections*, 1994-2010 (2001).
 47. Michaux-Charachon, S., Foulongne, V., O'Callaghan, D. & Ramuz, M. [Brucella at the dawn of the third milenium: genomic organization and pathogenesis]. *Pathol Biol (Paris)* **50**, 401-12 (2002).
 48. Sola-Landa, A. et al. A two-component regulatory system playing a critical role in plant pathogens and endosymbionts is present in *Brucella abortus* and controls cell invasion and virulence. *Mol Microbiol* **29**, 125-38 (1998).
 49. Guzman-Verri, C. et al. The two-component system BvrR/BvrS essential for *Brucella abortus* virulence regulates the expression of outer membrane proteins with counterparts in members of the Rhizobiaceae. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 12375-80 (2002).
 50. Delrue, R.-M. in *Faculté des sciences* 272 (Facultés universitaires Notre-Dame de la Paix, Namur, 2002).
 51. Halling, S. M. On the presence and organization of open reading frames of the nonmotile pathogen *Brucella abortus* similar to class II, III, and IV flagellar genes and to LcrD virulence superfamily. *Microb Comp Genomics* **3**, 21-9 (1998).
 52. Fretin, D. in *Faculté des sciences* 112 (Facultés universitaires Notre-Dame de la Paix, Namur, 2003).
 53. Lestrade P, D. R., Danese I, Didembourg C, Taminiau B, Mertens P, De Bolle X, Tibor A, Tang CM, Letesson JJ. Identification and characterization of in vivo attenuated mutants of *Brucella melitensis*. *J Bacteriol*. **183**, 6404-12 (2000).

54. Dricot, A. in *Faculté des sciences* 96 (Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix, Namur, 2000).
55. Pierard, V. in *Faculté des sciences* 96 (Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix, Namur, 2002).
56. Miller, J. H. *Experiments in Molecular Genetics* (ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, C. S. H., NY) (1972).
57. Boschioli. Brucellosis: a worldwide zoonosis. *Curr Opin Microbiol.* (2001).
58. Letesson JJ, L. P., Delrue RM, Danese I, Bellefontaine F, Fretin D, Taminiau B, Tibor A, Dricot A, Deschamps C, Haine V, Leonard S, Laurent T, Mertens P, Vandenhoute J, De Bolle X. Fun stories about Brucella: the "furtive nasty bug". *Vet Microbiol.* **90**, 317-28 (2002).